

## **ZAŁĄCZNIK 3**

**dr inż. Anna Chlebowska – Śmigiel  
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Wydział Nauk o Żywności  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**

## **AUTOREFERAT**

**z opisem osiągnięć naukowych  
związanych z postępowaniem habilitacyjnym**

**Warszawa, 2019**

## Spis treści

<b>1. Dane osobowe .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Posiadane dyplomy, tytuły i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....</b>	<b>3</b>
<b>4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789.....</b>	<b>5</b>
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	5
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.....	5
4.3. Omówienie celu naukowego publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....	7
4.3.1. Wstęp .....	7
4.3.1.1. Charakterystyka prebiotyków .....	7
4.3.1.2. Charakterystyka pullulanu .....	8
4.3.2. Cel naukowy oraz omówienie wyników badań .....	10
4.3.3. Weryfikacja zdolności wykorzystania pullulanu jako źródła węgla przez bakterie z rodzaju <i>Lactobacillus</i> i analiza wpływu suplementacji podłoża hodowlanego pullulanem na wzrost i aktywność metaboliczną wybranych bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> w badaniach modelowych .....	11
4.3.4. Ocena <i>in vitro</i> możliwości wykorzystania pullulanu jako źródła węgla przez drobnoustroje stanowiące mikroflorę przewodu pokarmowego niemowląt...16	
4.3.5. Wykazanie korzystnego wpływu dodatku pullulanu na cechy fizykochemiczne jogurtów naturalnych i przeżywalność LAB podczas ich chłodniczego przechowywania oraz akceptowalności konsumenckiej wytworzonych jogurtów naturalnych .....	21
4.3.6. Ocena możliwości zastosowania pullulanu jako substancji niskotłuszczowej w parzonych, homogenizowanych kiełbasach .....	26
<b>5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....</b>	<b>37</b>
5.1. Wpływ przechowywania i obróbki technologicznej na zmiany mikrobiologiczne i fizykochemiczne wybranych produktów spożywczych .....	40
5.2. Suplementacja podłoża hodowlanego związkami magnezu i jej wpływ na aktywność wybranych szczepów grzybów i bakterii kwasu mlekowego .....	41
5.3. Przeciwdrobnoustrojowa aktywność bakterii mlekowych, produktów fermentowanych orientalnych i ekstraktów ziołowych .....	42
5.4. Nowe trendy w technologii żywności - wykorzystanie właściwości funkcjonalnych EPS pochodzenia drożdżowego oraz wosku i pyłku pszczelego .....	44
5.5. Przechowywanie szczepów referencyjnych .....	44
<b>6. Podsumowanie pracy naukowo-badawczej .....</b>	<b>45</b>

## 1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: **Anna Chlebowska - Śmigiel**

Miejsce pracy: Wydział Nauk o Żywności  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
ul. Nowoursynowska 159C , 02-776 Warszawa

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2007 r.        **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Nauk o Żywności  
**Stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia**  
Praca doktorska pt.: „Badania nad zastosowaniem pullulanu w postaci powłoki jadalnej jako czynnika trwałości wybranych surowców roślinnych” realizowana w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Gniewosz

1989 r.        **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Ekonomiczno–Rolniczy  
Studium Podyplomowe Doskonalenia Pedagogicznego  
Zaświadczenie nr 204/91

1988 r.-        **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Technologii Żywności  
Kierunek: technologia żywności i żywienia  
**Tytuł zawodowy magistra inżyniera technologii żywności**  
Praca magisterska pt.: „Analiza mikrobiologiczna procesu produkcji grzybni pieczarki” realizowana w Katedrze Technologii Przemysłu Fermentacyjnego i Owocowo-Warzywnego pod kierunkiem prof. dr hab. Romana A. Grzybowskiego

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.01.2010 –        **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
do chwili obecnej    Wydział Nauk o Żywności  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Adiunkt

- 01.03.2008–  
31.12.2009      **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Nauk o Żywności  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Starszy wykładowca z doktoratem
- 01.11.2007–  
28.02.2008      **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Nauk o Żywności  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Wykładowca
- 01.11.2003–  
31.10.2007      **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Technologii Żywności  
Katedra Technologii i Oceny Żywności  
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Uczestnik studiów doktoranckich (urlop bezpłatny)
- 01.10.2000–  
30.10.2003      **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Technologii Żywności  
Katedra Technologii i Oceny Żywności  
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Wykładowca
- 01.12.1989–  
30.09.2000      **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Technologii Żywności  
Katedra Technologii i Oceny Żywności  
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Asystent
- 17.12.1988–  
30.11.1989      **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
Wydział Technologii Żywności  
Katedra Przemysłu Fermentacyjnego i Owocowo-Warzywnego  
Zakład Mikrobiologii Technicznej  
Asystent stażysta

#### 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789)

##### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust.2 Ustawy z dnia 14 marca 2013 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) jest cykl sześciu publikacji naukowych

##### **Studia nad zastosowaniem pullulanu w żywności jako substancji dodatkowej o działaniu prebiotycznym**

##### 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę o ubieganie się o stopień doktora habilitowanego

**H1 Chlebowska – Śmigiel A., Gniewosz M. 2013:** Próba zastosowania pullulanu jako stymulatora wzrostu wybranych bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3 (88), 111 – 124.

**IF<sub>2013</sub> = 0,311; MNiSW<sub>2013</sub> = 15 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, planowaniu doświadczeń, opracowaniu metodyki badań, prowadzeniu badań, analizie i interpretacji wyników badań, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z wydawnictwem. Mój udział szacuję na 80%.*

**H2 Chlebowska – Śmigiel A., Gniewosz M., Wilczak P , Kamola D. 2014:** Wpływ dodatku pullulanu na wzrost i zdolności fermentacyjne wybranych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(95), 74-74.

**IF = 0; MNiSW<sub>2014</sub> =15 pkt.**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji, wiodącym udziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w badaniach i analizie wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z wydawnictwem Mój udział szacuję na 70%.*

**H3 Chlebowska – Śmigiel A., Gniewosz M., Kieliszek M., Bzducha-Wróbel A. 2017:** The effect of pullulan on the growth and acidifying activity of selected stool microflora of human. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18 (2), 121-126.

**IF<sub>2017</sub> = 1,819; MNiSW<sub>2017</sub>: 30 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wiodącym udziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w badaniach i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z wydawnictwem Mój udział szacuję na 70%.*

**H4** Kycia K., **Chlebowska - Śmigiel A.**, Gniewosz M., Sokół E. **2018**: Effect of pullulan on the physicochemical properties of yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 1, 64-70.

**IF** 2018 = **1,225**; **MNiSW** 2018: **25 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w planowaniu doświadczeń i opracowaniu metodyki badań, nadzorowaniu prowadzonych badań, poszukiwaniu literatury, analizie i interpretacji wyników badań, współudziale w przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**H5 Chlebowska – Śmigiel A.**, Kycia K., Neffe-Skocińska K., Kieliszek M., Gniewosz M., Kołożyn-Krajewska D. **2019**: Effect of pullulan on physicochemical, microbiological, and sensory quality of yogurts. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20, DOI: 10.2174/1389201020666190416151129

**IF** 2018: **1,819**; **MNiSW** 2018: **30 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu oznaczeń mikrobiologicznych i chemicznych, poszukiwaniu dostępnej literatury, analizie i opracowaniu wyników oznaczeń, analizie statystycznej wyników, przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

**H6** Cegiełka A., Gniewosz M., Hać – Szymańczuk E., **Chlebowska – Śmigiel A.** **2017**: Effect of the addition of pullulan on the quality of low-fat homogenized scalded sausages. *CyTa Journal of Food*, 15, 147 – 154.

**IF** 2017 = **1,371**, **MNiSW** 2017: **20 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał współudziale w planowaniu doświadczeń, opracowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu części badań, analizie i interpretacji wyników badań, sformułowaniu wniosków, współudziale w przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 45 %.*

Oświadczenia współautorów odnośnie ich udziału we wspólnych publikacjach stanowiących jednotematyczny cykl zostały zamieszczone w **załączniku 5**.

Osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych zostało przedstawione w publikacjach o łącznej wartości współczynnika **IF\* = 6,545; (135 pkt. MNiSW\*\*)**

Wartość Indexu Hirscha wg bazy Web of Science wynosi **3**, zaś liczba cytowań **22 (20 bez autocytowań)**.

Wartość Indexu Hirscha wg bazy Elsevier Scopus wynosi **3**, liczba cytowań **30 (29 bez autocytowań)**.

*\*Wartość IF z roku publikacji, a w przypadku publikacji za lata 2018 i 2019 podano ostatnio wykazany. \*\*Liczba punktów wg listy recenzowanych czasopism naukowych określona przez MNiSW*

### 4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

#### 4.3.1. Wstęp

##### 4.3.1.1. Charakterystyka prebiotyków

Ustalona w 2007 roku przez FAO/WHO definicja prebiotyków określa je jako „niezdolne do życia składniki pokarmowe, które wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza w związku z modulacją zespołu mikroorganizmów jelitowych” Definicja ta została zaktualizowana w grudniu 2016r., zgodnie wiedzą o najnowszych osiągnięciach naukowych i klinicznych i obecnie określa ona prebiotyk jako „substrat, który jest selektywnie wykorzystywany przez wykazujące korzystne efekty zdrowotne mikroorganizmy gospodarza”. Rozszerza ona koncepcję prebiotyków, uznając za nie nie tylko stosowane powszechnie węglowodany, ale również polifenole i wielonienasycone kwasy tłuszczowe przekształcone w odpowiednie metabolity. Chociaż większość obecnych prebiotyków podaje się doustnie, można je również podawać bezpośrednio do innych skolonizowanych mikrobiologicznie miejsc ciała, takich jak pochwa i skóra. Skutki zdrowotne prebiotyków obecnie obejmują, między innymi, korzyści w obrębie przewodu pokarmowego (hamowanie patogenów, stymulacja immunologiczna), kardiometabolizm (np. obniżenie poziomu lipidów we krwi), zdrowie psychiczne (np. metabolity wpływające na funkcjonowanie mózgu) i kości (np. biodostępność minerałów). Utrzymano wymóg selektywnych mechanizmów, w których pośredniczy mikroflora. Korzystne skutki zdrowotne muszą być udokumentowane, aby substancja mogła być uznana za prebiotyk. [Śliżewska i wsp. 2013; Gibson i wsp. 2017]. Aby substancja podawana doustnie z pożywieniem została zatwierdzona jako prebiotyk musi spełnić wiele wymagań: podlegać procesowi fermentacji przez mikroflorę jelitową, selektywnie stymulować wzrost i/lub aktywność szczepów wywierających pozytywny wpływ na zdrowie, takich jak *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Eubacterium*, obniżać pH treści jelitowej chroniąc przed rozwojem drobnoustrojów chorobotwórczych, m.in. z rodzajów *Clostridium* czy *Bacteroides*, wywierać miejscowo korzyści w układzie pokarmowym człowieka, nie ulegać działaniu soku żołądkowego, wykazywać odporność na hydrolizę i enzymy występujące w przewodzie pokarmowym, nie być wchłaniana w górnych odcinkach układu pokarmowego, być wykorzystywana jako substrat dla pożytecznych drobnoustrojów bytujących w okrężnicy, wykazywać stabilność w procesach przetwórstwa spożywczego, mieć niską energetyczność, < 9 kJ/g. [Gibson & Roberfroid 1995; Holzapfel & Schillinger 2001; Gibson i wsp. 2017].

Prebiotyki można wprowadzić do wielu produktów spożywczych, gdzie traktowane są jako błonnik pokarmowy (m.in. pektyny, gumy, fruktooligosacharydy, izomaltooligosacharydy, ksylooligosacharydy, oligosacharydy sojowe, inuliny, laktuloza i skrobie odporne) [Roberfroid 2007]. Substancje te, spożyte przez człowieka, są wykorzystywane przez szczepy

z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. W efekcie ich fermentacji oprócz kwasu mlekowego powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), korzystne dla przewodu pokarmowego. Obok znanych i stosowanych już związków o udokumentowanych właściwościach prebiotycznych poszukuje się nowych substancji, które mogą odpowiadać kryteriom stawianym prebiotykom i stanowić dodatkowy, korzystny składnik produktu spożywczego. Taką substancją może być pullulan [Ryan i wsp. 2006].

#### 4.3.1.2. Charakterystyka pullulanu

Pullulan jest zewnątrzkomórkowym polisacharydem wytwarzanym wyłącznie na drodze biosyntezy mikrobiologicznej przez *Aureobasidium pullulans*. Czasteczka pullulanu jest zbudowana z pierścieni  $\alpha$ -glukopiranozydowych, połączonych ze sobą wiązaniami (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glikozydowymi w tri- i tetrasacharydowe jednostki, które z kolei są powiązane wiązaniami (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glikozydowymi, co ma wpływ na wiele korzystnych cech pullulanu [Leathers 2003]. Uzyskane na drodze modyfikacji genetycznych nowe szczepy *Aureobasidium* nie wytwarzają związków melaninowych i mogą syntetyzować pullulan z wyższą wydajnością niż szczepy rodzicielskie [Gniewosz i Duszkiewicz-Reinhard 2008]. Oczyszczony preparat pullulanowy ma postać białego proszku, nie posiada smaku ani zapachu, bardzo dobrze rozpuszcza się w ciepłej i zimnej wodzie. Roztwory pullulanu są bezbarwne i lepkie, ale nie tworzą żeli, niezależnie od pH oraz temperatury [Singh i wsp. 2008].

Pullulan ma wartość LD<sub>50</sub> większą niż 14,289 g/kg ciała myszy. Śmiertelność zwierząt doświadczalnych przy 14,28 g pullulanu /kg ciała myszy wynosi zero [Okada i wsp. 1990]. Przeprowadzono testy na chroniczną toksyczność oraz właściwości mutagenne pullulanu dowiodły, że jest to związek nieszkodliwy i nie wykazujący zdolności mutagennych. Dodatkowo testy przeprowadzone na szczurach wykazały, że może on być stosowany w diecie w ilości 10% bez negatywnego wpływu na zmiany zdrowotne u testowanych zwierząt [Kimoto i wsp. 1997]. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* stwierdzono, że obecność pullulanu w diecie człowieka obniża stężenie glukozy we krwi aż o 54% w porównaniu do próby kontrolnej. Sugeruje to, że pullulan jest trawiony bardzo powoli i jest słabo wchłaniany przez przewód pokarmowy. W związku ze spowolnieniem czasu wzrostu i obniżenia poziomu glukozy we krwi, a tym samym eliminacji gwałtownych napadów głodu może on znaleźć zastosowanie w żywności dla diabetyków i osób odchudzających się [Wolf i wsp. 2003; Spears i wsp. 2005].

Podsumowując dotychczasowe doniesienia literatury światowej, pullulan wykazuje wiele cech charakterystycznych dla prebiotyków: ulega tylko częściowej hydrolizie przy udziale amylazy ślinowej i trzustkowej, a enzymy jelita cienkiego rozkładają go tworząc zaledwie 2,7% glukozy. Jest fermentowany przez mikroflorę jelita grubego do SCFA. Charakteryzuje się niską kalorycznością wynoszącą 8,70



kJ/g (2,10 kcal) [Bryan i wsp. 2003; Singh i wsp. 2008]. Pullulan jest substancją dopuszczoną do stosowania w żywności. Od roku 2002 jest na liście GRAS, w roku 2004 został zatwierdzony przez Unię Europejską jako substancja dodatkowa do stosowania w żywności. Określono maksymalną dawkę pullulanu i stwierdzono, że osoby dorosłe mogą spożyć około 2,3 g pullulanu/dzień. Decyzją Głównego Inspektora Sanitarnego z 28 lipca 2005 roku został dopuszczony w Polsce jako składnik listków odświeżających oddech i otrzymał numer E1204 [Gniewosz 2009]

#### 4.3.2. Cel naukowy oraz omówienie wyników badań

Celem naukowym Osiągnięcia, będącego podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) jest:

- weryfikacja zdolności wykorzystania pullulanu jako źródła węgla przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i analiza wpływu suplementacji podłoża hodowlanego pullulanem na wzrost i aktywność metaboliczną wybranych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w badaniach modelowych **(H1,H2)**
- ocena *in vitro* możliwości wykorzystania pullulanu jako źródła węgla przez drobnoustroje stanowiące mikroflorę przewodu pokarmowego niemowląt **(H3)**
- wykazanie korzystnego wpływu dodatku pullulanu na cechy fizykochemiczne jogurtów naturalnych i przeżywalność LAB podczas ich chłodniczego przechowywania oraz akceptowalności konsumenckiej wytworzonych jogurtów naturalnych **(H4, H5)**
- ocena możliwości zastosowania pullulanu jako substancji niskotłuszczowej w parzonych, homogenizowanych kiełbasach **(H6)**

Pullulan i możliwości jego aplikacji jako składnika powłok jadalnych w przetwórstwie żywności były przedmiotem moich badań w ramach realizowanej w latach 2003-2007 pracy doktorskiej. W dostępnej literaturze, obok doniesień dotyczących optymalizacji procesu biosyntezy pullulanu, zastosowania jako powłoki lub filmu jadalnego, znalazłam również informacje o jego potencjalnych właściwościach prebiotycznych. W związku z tym, po uzyskaniu stopnia doktora podjęłam badania nad możliwością wykorzystania pullulanu przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jako substancji korzystnie wpływającej na ich wzrost lub aktywność metaboliczną. LAB są powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym, produkty otrzymywane z ich udziałem są chętnie spożywane. Zastosowanie pullulanu jako substancji dodatkowej o właściwościach prebiotycznych być może wpłynęłoby na poszerzenie asortymentu dostępnych produktach fermentowanych.

Warto podkreślić, że w ramach przedmiotowego osiągnięcia podjęto badania wpływu dodatku pullulanu na wzrost i aktywność LAB oraz jako substancji dodatkowej do produktów spożywczych, które wcześniej nie były analizowane przez innych badaczy, bądź były prowadzone w innym zakresie.

#### 4.3.3. Weryfikacja zdolności wykorzystania pullulanu jako źródła węgla przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i analiza wpływu suplementacji podłoża hodowlanego pullulanem na wzrost i aktywność metaboliczną wybranych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w badaniach modelowych

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) od lat wykorzystywane są przez ludzi do produkcji żywności i stosowane w wielu dziedzinach przemysłu spożywczego. Dzięki ich właściwościom fermentacyjnym otrzymuje się kiszonki warzywne, jogurty, kefiry, sery ale także fermentowane przetwory mięsne, sojowe, żywność orientalną oraz pieczywo żytnie [Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro 2010]. Jednocześnie stanowią one naturalną mikroflorę układu pokarmowego ludzi. Mają zdolność do tworzenia witamin z grupy B, które odgrywają istotną rolę w procesach metabolicznych organizmu [Arnoldi 2004]. Dodawane do produktów spożywczych składniki bioaktywne, jak błonnik pokarmowy, inulina czy fruktooligosacharydy prowadzą do zmian zarówno w składzie, jak i aktywności mikroflory przewodu pokarmowego, co przynosi korzyści dla zdrowia i samopoczucia konsumenta [Cieślik i Gębusia 2011; Charalampopoulos & Rastall 2012]. W licznych badaniach wykazano wpływ tych związków na stymulację wzrostu bakterii probiotycznych z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [Ghoddusi i wsp. 2007; Jałosińska 2007; Pompei i wsp. 2008; Hernandez-Hernandez i wsp. 2012]. W dostępnej literaturze światowej dane na temat właściwości prebiotycznych pullulanu są jednak bardzo ograniczone. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że pullulan, m.in. stymuluje wzrost szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* [Ryan i wsp. 2006; Singh i wsp. 2008]. W związku z tym, postawiona przeze mnie **pierwsza hipoteza badawcza miała na celu sprawdzenie, czy bakterie kwasu mlekowego są zdolne do wykorzystania pullulanu jako źródła węgla.**

Do badań wybranych zostało 25 szczepów probiotycznych i potencjalnie probiotycznych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (**H1**), pochodzących z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Zakładu Biotechnologii Mleka SGGW w Warszawie oraz Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Materiał do badań stanowił handlowy pullulan, pochodzący z firmy Focubase (Chiny). Badania prowadzono w podłożu MRS (de Man, Rogosa and Sharpe medium), zmodyfikowanym dodatkiem glukozy i pullulanu. Podłoża kontrolne stanowiły płynne podłoża MRS, ze zróżnicowaną zawartością glukozy – od 0,0 do 2,0 % (v/v) oraz pozostałymi składnikami, jak w standardowym podłożu. W podłożach doświadczalnych glukozę zastąpiono pullulanem w stężeniu 0,5; 1,0; 1,5 lub 2,0 %. Zastosowano także zmodyfikowane podłoże MRS, zawierające równocześnie 2,0 % glukozy i 2,0 % pullulanu (**H1**, **H2**). Podłoża kontrolne oraz doświadczalne (bez pullulanu) sterylizowano w autoklawie (121 °C przez 20 min). Wodny roztwór pullulanu wyjaławiano przez filtrację przy użyciu jałowych filtrów o średnicy porów 0,47 µm (Whatman, Niemcy) i dodawano po sterylizacji do ostudzonych podłoży (**H1**, **H2**, **H3**). W celu

przygotowania inokulum bakterie inkubowano przez 24 h, w zależności od preferencji temperaturowych szczepu, w 30 °C (wszystkie szczepy z gatunku *L. plantarum* i szczep *L. arabinosus*) lub w 37 °C (szczepy z gatunku *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei* i *L. paracasei*). Następnie hodowle poddawano wirowaniu. Odwirowaną biomasę bakterii zawieszano w roztworze soli fizjologicznej tak, aby stężenie komórek wynosiło  $10^8$  jtk / ml (0,5 ° McFarlanda) a następnie rozcieńczano dziesięciokrotnie, aż do uzyskania liczby komórek rzędu  $10^6$  jtk/ml (**H1**) lub  $10^5$  jtk/ml (**H2**). Tak przygotowane zawiesiny szczepów przenoszono do uprzednio przygotowanych podłoży kontrolnych i doświadczalnych (**H1,H2**).

Do hodowli szczepów wykorzystano automatyczny analizator wzrostu mikroorganizmów Bioscreen C (Yo AB Ltd, Growth Curves, Helsinki, Finlandia). Badania prowadzono przez 48h w 30°C (I etap) i 37°C (II etap), w zależności od wymagań temperaturowych LAB. Każdy wariant podłoża z badanym szczepem bakterii przygotowano w trzech powtórzeniach, wprowadzając 360 µl podłoża i 40 µl badanego szczepu. Wzrost szczepów mierzono przy użyciu turbidymetrycznej metody z zastosowaniem filtra szerokopasmowego (420-580 nm), który jest mniej wrażliwy na zmianę barwy podłoża. Absorbancję mierzono przez 48h, w odstępach 2 - godzinnych, po uprzednim automatycznym wytrząsaniu próbek przez 20 sekund przed każdym odczytem (**H1**). Równolegle prowadzono hodowle badanych bakterii w kolbach, w podłożach kontrolnych i doświadczalnych o objętości 50 ml, z zachowaniem takich samych warunków temperatury i czasu hodowli. Po 24 i 48h hodowli oznaczano zmiany pH oraz kwasowości ogólnej.

Z 25 poddanych badaniom szczepów LAB, w przypadku 12 z nich uzyskałam zadowalające wyniki. Były to szczepy: *Lactobacillus paracasei* ŁOCK 0919, *Lactobacillus plantarum* 44, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01149, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01834, *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lactobacillus acidophilus* Bauer 1, *Lactobacillus acidophilus* CH- 2, *Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus acidophilus* Lac 4, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014 (**H1**). Analiza zmian gęstości optycznej (OD) podczas 48h hodowli pokazała, że dodatek pullulanu jako źródła węgla, w zastosowanych stężeniach spowodował niewielki wzrost biomasy badanych bakterii. Uzyskane wartości OD mieściły się w granicach od 0,4 (dla *L. casei* ATCC 393, *L. arabinosus* ATCC 8014, *L. acidophilus* Bauer 1, *Lactobacillus acidophilus* CH- 2, *Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus acidophilus* Lac 4) do nieco powyżej 0,6 (dla *L. plantarum* 44, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01149, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01834, *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080 i *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469). Wyższe wartości OD zaobserwowałam w pożywkach kontrolnych (MRS z zawartością glukozy od 0,5 do 2,0%). Maksymalne wartości OD w tych hodowlach, w zależności od szczepu bakterii, mieściły się w przedziale 0,8 – 1,5. Na podstawie otrzymanych wyników zmian gęstości optycznej można

wnioskować, że pullulan był w małym stopniu wykorzystany przez badane szczepy bakterii, czego powodem mogła być ich słaba zdolność do enzymatycznej hydrolizy pullulanu. Źródła literaturowe podają, że zidentyfikowano pięć typów enzymów z grupy pullulanaz, pochodzących z różnych drobnoustrojów, które są w stanie rozłożyć cząsteczkę pullulanu. [Domań – Pytka i Bardowski 2004]. Z kolei Ryan i wsp. [2006] w swoich badaniach wykazali, że tylko nieliczne szczepy *Bifidobacterium* wytwarzają pullulanazy rozkładające ten związek. Ze sprawdzonych 42 szczepów *Bifidobacterium* tylko 11 było zdolnych do wykorzystania pullulanu jako źródła węgla. W badaniach Mäkeläinen i wsp. [2010] nad zdolnością fermentowania 11 różnych substancji z grupy xylo-oligosacharydów, w tym pullulanu, na wzrost, m.in. wybranych 14 szczepów *Bifidobacterium* i 4 szczepów *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *bulgaricus*, *paracasei* i *ramnosus*). Tylko szczepy *Bifidobacterium lactis* Bi-07, *Bf. lactis* Bb-12 i *Bf. lactis* 420 wykazywały wzrost w podłożu z pullulanem. Zdaniem autorów było to związane z budową i wielkością cząsteczki pullulanu.

Interesujące wyniki uzyskałam podczas hodowli bakterii w pożywce z dodatkiem zarówno glukozy, jak też pullulanu. Dla dziesięciu z badanych szczepów zaobserwowano istotnie wyższe wartości OD niż uzyskane w tym samym czasie w podłożu MRS, zawierającym tylko glukozę. Uzyskane wyniki mieściły się w granicach od 1,4 do 1,8 w zależności od szczepu. Najlepszy efekt stymulujący wzrost zaobserwowano w przypadku szczepu *L. plantarum* 44. Najwyższą wartość OD uzyskano po 48h hodowli i była ona 2,5 - krotnie wyższa od uzyskanej dla tego szczepu podczas hodowli w podłożu suplementowanym 2 % dodatkiem glukozy. Najniższy wynik stymulacji wzrostu uzyskano dla szczepu *L. casei* ATCC 393 i *L. paracasei* LOCK 0919. Po 48h hodowli wartości OD podłoża z glukozą i pullulanem były wyższe tylko od 6 do 9% w porównaniu z podłożem z glukozą.

Zaobserwowałam także, że dodatek pullulanu do podłoża spowodował wydłużenie fazy logarytmicznego wzrostu badanych szczepów między 12 a 15 godziną hodowli. Efekt stymulacji wzrostu większości badanych bakterii obserwowano maksymalnie do 24 godziny hodowli. Wyjątek stanowiły szczepy *L. plantarum* 44 i *L. plantarum* NCAIM B.01149, w hodowli których faza logarytmicznego wzrostu trwała do 36 godziny hodowli.

Przeprowadzono także badanie zmian pH oraz kwasowości ogólnej po 24 i 48 godzinach hodowli. Najlepsze wyniki uzyskano w zmodyfikowanym podłożu MRS z 2,0% zawartością glukozy oraz podłożu zawierającym 2,0% glukozy i 2,0% pullulanu (**H1**). Nie odnotowano istotnych różnic w wartościach pH pomiędzy hodowlami w obu podłożach, otrzymane wartości pH po 24h hodowli były nieznacznie wyższe w podłożu z glukozą i pullulanem. Dla wszystkich badanych szczepów po 48 h hodowli odnotowano nieznaczne obniżenie pH, zarówno w podłożu z glukozą, jak też w podłożu z glukozą i pullulanem.

Podobnie, nie zaobserwowano istotnych różnic w kwasowości ogólnej, bez względu na zastosowane podłoże. Jedynie w hodowli *L. acidophilus* CH-5 stwierdzono wyższą kwasowość ogólną zmodyfikowanego podłoża MRS z zawartością 2,0% glukozy i 2,0% pullulanu, zarówno po 24, jak i 48h hodowli. Równocześnie wzrost tego szczepu był stymulowany przez dodatek pullulanu.

Podsumowując, dodatek pullulanu do podłoża MRS stymulował wzrost większości badanych szczepów z rodzaju *Lactobacillus*. W podłożach MRS zawierających glukozę i pullulan obserwowano wydłużenie fazy logarytmicznego wzrostu w porównaniu z podłożem niesuplementowanym pullulanem. Pullulan dodany w stężeniu 2,0% do podłoża MRS najlepiej stymulował wzrost i aktywność fermentacyjną szczepu *L. acidophilus* CH-5 i *L. plantarum* 44.

Uzyskane wyniki wskazywały, że pullulan ma korzystny wpływ na wzrost i zdolności kwasotwórcze wybranych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, co może sugerować, że związek ten wykazuje właściwości prebiotyczne w stosunku do bakterii z tego rodzaju. LAB fermentują sacharydy, wytwarzając głównie kwas mlekowy, ale także kwas octowy, aldehyd octowy, dwutlenek węgla, diacetyl, acetoinę czy butanodiol. Powstałe produkty przemiany materii, zwłaszcza kwasy organiczne i niskocząsteczkowe kwasy tłuszczowe (SCFA) pełnią rolę konserwującą i zapobiegają wielu chorobom [Pan i wsp. 2009]. Ich korzystny wpływ na zdrowie człowieka powoduje, że zarówno bakterie kwasu mlekowego, jak też produkty powstałe z ich udziałem są chętnie spożywane przez konsumentów. W związku z tym podjęto dalsze badania, mające na celu sprawdzenie szczepów LAB, dla których uzyskano najlepsze wyniki, pod kątem zmiany ich liczebności oraz wytwarzania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych podczas hodowli w podłożach suplementowanych pullulanem.

W kolejnych badaniach (**H2**) wykorzystałam 9 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*: *Lactobacillus brevis* ZBM 11, *Lactobacillus plantarum* 44, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01149, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B.01834, *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080, *Lactobacillus acidophilus* CH-2, *Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus casei* ATCC 393 i *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014. Na podstawie uzyskanych wyników (**H1**) do kolejnego etapu badań (**H2**) zastosowałam tylko podłoże kontrolne MRS z 2% dodatkiem glukozy (standardowe) oraz podłoże MRS zmodyfikowane (z 2% glukozy i 2% pullulanu). Inokulum bakterii przenoszono w objętości 5 ml do uprzednio przygotowanych podłoży kontrolnych i doświadczalnych (**H2**). Liczbę komórek LAB, wprowadzonych do podłoża w czasie „0” i uzyskanych po 24 h hodowli, sprawdzano metodą płytkową. Aby uzyskać materiał do ilościowego i jakościowego oznaczenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), hodowle wirowano. Oznaczenie SCFA w supernatancie wykonywano wykorzystując techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzęgniętej z detektorem UV (HPLC-UV).

Po 24h hodowli zaobserwowano wzrost wszystkich badanych szczepów LAB w podłożu doświadczalnym suplementowanym pullulanem oraz w podłożu kontrolnym MRS. Liczba bakterii wzrosła z  $10^4$  jtk/ml do  $10^7 - 10^9$  jtk/ml, w zależności od szczepu bakterii. Nie zaobserwowano istotnych różnic między liczbą bakterii w podłożu kontrolnym i doświadczalnym z pullulanem. Tylko w przypadku dwóch szczepów *L. acidophilus* (CH-5 i CH-2) oraz *L. plantarum* NCAIM B. 01149 odnotowano nieco wyższą liczebność bakterii w podłożu doświadczalnym z pullulanem. Różnice były niewielkie i wynosiły odpowiednio 0,11; 0,09 i 0,08 jednostki logarytmicznej. Szydłowska i Kołożyn-Krajewska [2010], prowadząc fermentację przecieru z dyni z dodatkiem 1,5, 3 i 4,5% inuliny przy użyciu szczepu *L. casei* KN 291 uzyskały wzrost liczby komórek o 2 jednostki logarytmiczne. Z kolei w badaniach Gustawa i wsp. [2011] dodatek 1% FOS spowodował wzrost liczby *Lb. acidophilus* do 7,8 log jtk/g ale taki sam dodatek inuliny nie przyczynił się do zwiększenia liczebności komórek tego szczepu. Na podstawie uzyskanych wyników własnych oraz cytowanych autorów można wnioskować, że poszczególne prebiotyki mają bardzo zróżnicowany wpływ na szczepy LAB i mogą stymulować wzrost i/lub aktywność metaboliczną tylko wybranych.

Analizując uzyskaną podczas badań sumę krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) zauważyłam dużą rozpiętość wyników, w zależności od użytego szczepu oraz podłoża. Były one istotnie wyższe w podłożu kontrolnym MRS niż uzyskane w podłożu z dodatkiem pullulanu. Wśród badanych kwasów stwierdzono najwięcej kwasu mlekowego (od 32,30 do 53,08 mM) i octowego (od 8,78 do 90,55 mM), znacznie mniejsze ilości kwasu mrówkowego, propionowego i hydroksymasłowego. W czasie hodowli w podłożu z pullulanem jedynie *L. casei* ATCC 393 wytworzył w sumie o 6% więcej SCFA, niż w podłożu kontrolnym. Choć całkowita suma SCFA uzyskana w podłożu suplementowanym pullulanem była niższa, to jednak dało się zaobserwować różnice w ilościach poszczególnych kwasów, w zależności od użytego szczepu bakterii. Większość badanych szczepów wytworzyła istotnie mniejszą ilość kwasu mlekowego, chociaż otrzymane wartości mieściły się w podobnych granicach (od 33,28 do 52,56 mM). Dla dwóch szczepów - *L. casei* ATCC 393 i *L. acidophilus* CH-5 - w badanym podłożu odnotowano istotnie większe zawartości kwasu mlekowego niż w podłożu kontrolnym MRS. Najlepszy wynik suplementacji podłoża MRS pullulanem osiągnięto w przypadku kwasu octowego. W podłożu tym 5 spośród badanych szczepów: *L. brevis* ZBM 11 i *L. arabinosus* ATCC 8014 oraz trzy szczepy *L. plantarum* (NCAIM B. 01834, ATCC 4080 i 44) wytworzyło istotnie więcej tego kwasu. Zawartość kwasu octowego w hodowli *L. plantarum* 44 i *L. arabinosus* ATCC 8014 była dwukrotnie większa niż w podłożu kontrolnym MRS. Z kolei różnice w ilości tego kwasu między hodowlą w podłożu z pullulanem a kontrolną wynosiły ok. 10mM dla szczepów *L. plantarum* NCAIM B.01149 i *L. plantarum* ATCC 4080 oraz ok. 5mM dla *L. brevis*. Nie zaobserwowałam korzystnego wpływu suplementacji podłoża pullulanem na wzrost zawartości kwasu mrówkowego

i hydroksymasłowego. natomiast dwa z badanych szczepów - *L. acidophilus* CH-2 i *L. arabinosus* ATCC 8014 wytworzyły istotnie więcej kwasu propionowego.

Różnice w ilości badanych kwasów mogą być wynikiem odmiennego metabolizmu fermentacyjnego badanych szczepów LAB [Libudzisz i wsp. 2008], ponieważ były wśród nich zarówno bakterie homo- jak i heterofermentatywne. Cechą charakterystyczną procesu homofermentacji glukozy jest otrzymanie kwasu mlekowego jako głównego produktu końcowego. Badane bakterie homofermentacji mlekowej z gatunku *L. acidophilus* i *L. casei* wytworzyły więcej tego kwasu w podłożu z dodatkiem pullulanu. Z kolei bakterie bezwzględnie heterofermentatywne, jak *L. brevis* czy względnie heterofermentatywne, jak *L. plantarum*, fermentujące glukozę do kwasu mlekowego i octowego, zwiększyły syntezę obu kwasów w podłożu suplementowanym pullulanem.

Reasumując otrzymane wyniki można stwierdzić, że wszystkie badane szczepy LAB po 24h hodowli wykazywały wzrost i zdolności fermentacyjne w podłożu suplementowanym pullulanem. Dodatek pullulanu w stężeniu 2% do podłoża MRS nie wpłynął stymulująco na zwiększenie liczby komórek badanych szczepów bakterii *Lactobacillus*, natomiast wpłynął na zwiększenie zawartości niektórych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w przypadku 8 z 9-ciu badanych szczepów bakterii. *L. acidophilus* CH-5 i *L. casei* ATCC 393 charakteryzowały się zwiększonym wytwarzaniem kwasu mlekowego, a *L. brevis* ZBM 11, *L. arabinosus* ATCC 8014, *L. plantarum* NCAIM B. 01834, *Lb. plantarum* ATCC 4080 i *Lb. plantarum* 44 wytworzyły więcej kwasu octowego niż w podłożu MRS. Z kolei w hodowli *L. acidophilus* CH-2 otrzymano najwięcej kwasu propionowego. Podobnie, więcej kwasu propionowego, wytworzył szczep *L. arabinosus* ATCC 8014. Jedynie szczep *L. plantarum* NCAIM B. 01149 wykazywał zdecydowanie gorsze właściwości fermentacyjne w hodowli z dodatkiem pullulanu niż w podłożu kontrolnym MRS (H2).

Znalezione w dostępnej literaturze informacje o wynikach badań prowadzonych nad wykorzystaniem różnych prebiotyków przez mikroflorę kałową ludzi i zwierząt [Pan i wsp. 2009; Ramnani i wsp. 2012] skłoniły mnie do dalszych badań i postawienia kolejnej **hipotezy badawczej dotyczącej możliwości metabolizowania pullulanu przez mikroflorę jelita grubego człowieka**

#### **4.3.4. Ocena *in vitro* możliwości wykorzystania pullulanu jako źródła węgla przez drobnoustroje stanowiące mikroflorę przewodu pokarmowego niemowląt**

Pierwsze doniesienia dotyczące badania właściwości prebiotycznych pullulanu opublikowano w roku 1990. Badania wykonane *in vitro* wykazały, że amylazy ślinowe i trzustkowe rozkładają pullulan do mniejszych molekuł, i sugerowały, że mogą być one następnie fermentowane przez mikroflorę okrężnicy do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [Okada i wsp. 1990; Yoneyama



*i wsp. 1990*]. Jednakże wyniki badań przeprowadzone *in vivo* nie dostarczyły jednoznacznych dowodów na potwierdzenie tej hipotezy. Nieliczne były również badania dotyczące wpływu pullulanu na liczebność mikroflory jelitowej. Z opublikowanych w 1990 r. badań wynikało, że pullulan podawany w diecie ośmiu dorosłym wolontariuszom w dawce 10 g / dzień przez 14 dni spowodował dzienny przyrost masy kału o 40 % i przyczynił się do zwiększenia procentowej zawartości bifidobakterii w ich kale ( z 12% do 25%) w stosunku do próbek kału grupy osób kontrolnych [*Mitsuhashi i wsp. 1990*]. Stwierdzono również że pullulan jest bardzo słabo hydrolizowany przez enzymy trawienne człowieka [*Nakamura 1984*]. Mikroflora jelita grubego stanowi ok. 40-50% jego treści (ok.  $10^{11}$ - $10^{12}$  komórek/g treści). Normalna flora przewodu pokarmowego człowieka zawiera wiele różnorodnych populacji bakterii, które odgrywają istotną rolę w rozwoju, zdrowiu i dobrym samopoczuciu gospodarza. Wśród drobnoustrojów kolonizujących nabłonek jelita na szczególną uwagę zasługują bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, których liczebność waha się w granicach  $10^{10}$ - $10^{11}$  oraz *Lactobacillus* w liczbie  $10^8$ - $10^{10}$  jtk w 1 gramie treści jelita [*Turroni i wsp. 2008; Mroczyńska i wsp. 2011;*]. Mają one pozytywny wpływ na organizm człowieka, hamując rozwój patogenów i poprawiając odporność organizmu. W dostępnej literaturze światowej można znaleźć wiele informacji na temat wpływu stosowanych prebiotyków na mikroflorę kałową człowieka [*Alander i wsp. 2001; Cummings & Macfarlane 2002; Mäkeläinen i wsp. 2010; Butel 2014; Sims i wsp. 2014*]. Nieliczne badania dotyczące wpływu pullulanu sugerowały, że może on spełniać funkcję prebiotyku, stymulując wzrost pożytecznych bakterii jelitowych [*Bryan i wsp. 2003; Leathers 2003*] lub obniżając poziom glukozy we krwi znaleźć zastosowanie w żywności dla diabetyków [*Wolf i wsp. 2003; Spears i wsp. 2005; Singh 2008*] oraz, że w jelicie grubym człowieka niestrawiony pullulan ulega fermentacji przez mikroflorę kałową do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [*Ryan i wsp. 2006; Forsgren i wsp. 2010*].

Na podstawie wcześniejszych badań własnych (**H1, H2**) ustalono, że pullulan stymulował wzrost czystych kultur niektórych szczepów *Lactobacillus* w badaniach *in vitro*. Według *Roberfroida [2007]* sprawdzenie selektywnego stymulowania wzrostu i / lub aktywności bakterii jelitowych pod wpływem testowanych pod tym względem sacharydów powinno być badane w próbce kału, która zapewnia reprezentatywny układ gatunków bakterii, eksponowanych na badany związek. Również *Mäkeläinen i wsp. [2010]* sugerowali sprawdzanie działania prebiotyku w mieszaninie mikroflory kałowej. Autorzy wykazali, że różne rodzaje drobnoustrojów i grupy drobnoustrojów były zdolne do fermentacji testowanych oligosacharydów, co może wskazywać na występowanie różnic w ich wpływie na grupy drobnoustrojów w konkurencyjnym środowisku jelita grubego. Wg autorów, związki te mogą być fermentowane w okrężnicy w wyniku współpracy między różnymi grupami drobnoustrojów. Również nowe ustalenia dotyczące prebiotyków [*Gibson i wsp. 2017*] zalecają badanie działania substancji prebiotycznej w mieszaninie drobnoustrojów jelitowych ze względu na możliwość wykorzystania prebiotyku przez jedną grupę pożytecznych bakterii, a ich

metabolitów przez inne bakterie (z wyjątkiem patogennych) obecne w okrężnicy. Dlatego celem moich kolejnych badań była ocena wpływu pullulanu na wzrost i aktywność kwasotwórczą bakterii z rodzajów *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* oraz *Escherichia coli*, pochodzących z kału człowieka.

Materiałem do badań był handlowy pullulan (Focubase, Chiny). Do badań użyłam świeżych próbek kału pochodzących od trójki zdrowych, jednomiesięcznych niemowląt karmionych wyłącznie mlekiem matki i nie przyjmujących antybiotyków. niemowląt [H3]. W doborze próbek kału sugerowałam się wiekiem dzieci, w jelitach których występuje większa liczba prozdrowotnych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [Hopkins i wsp. 2002].

W badaniach wykorzystałam 2 podłoża kontrolne: standardowe podłoże RCM (Merck Millipore, Niemcy) oraz podłoże zmodyfikowane RCM, z którego usunięto skrobię rozpuszczalną oraz zwiększono stężenie glukozy do 2% (RCM+G). Podłożem doświadczalnym była kolejna zmodyfikowana pożywka RCM, w której skrobię rozpuszczalną i glukozę zastąpiono pullulanem w stężeniu 2% (RCM+P).

W celu przygotowania inokulum pobierano 1 g próbki kału, przenoszono do sterylnej wody peptonowej i homogenizowano przez 2 min. Następnie zawiesiny o objętości 300 µl przenoszono do kolbek z podłożami (RCM, RCM+G, i RCM+P). W celu zapewnienia środowiska beztlenowego kolby umieszczano w pojemniku z saszetkami AnaeroGen™ (Oxoid, USA). Próbkę inkubowano w 37°C przez 48 godzin. W czasie „0” oraz po 24 i 48h hodowli z każdej kolby pobierano po 1 ml i wykonywano rozcieńczenia dziesięciokrotne. W celu oznaczenia bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wysiewano 1 ml rozcieńczonej hodowli na płytkę Petriego i zalewano pożywką BSM (Sigma-Aldrich, USA). Do oznaczenia liczby bakterii *Lactobacillus* wykorzystano agar MRS (BTL, Polska), *E. coli* identyfikowano przy użyciu podłoża Chromocult Coliform-Agar (Merck Millipore, Niemcy). Inkubację płytek prowadzono w 37°C przez 48h w warunkach beztlenowych wykorzystując pojemniki z saszetkami AnaeroGen™ (Oxoid, USA). Po inkubacji liczono wyrosłe na płytkach kolonie, a wynik przeliczano na jtk/g kału.

Dodatkowo oznaczano zmiany pH oraz kwasowości ogólnej prowadzonych hodowli w czasie 0, 24 i 48h. Kwasowość ogólną oznaczano metodą miareczkową (H1, H2, H3) w płynie pohodowlanym, po uprzednim odwirowaniu biomasy komórkowej. Wynik miareczkowania przeliczano na zawartość kwasu mlekowego w g /100 ml płynu pohodowlanego.

Wzrost wszystkich badanych bakterii obserwowano tylko w pierwszych 24h hodowli. Po kolejnej dobie nie odnotowano już obecności żywych komórek *E. coli*. Analizując otrzymane wyniki zauważono, że bifidobakterie rosły najlepiej

w standardowym podłożu RCM oraz w podłożu ze zwiększoną zawartością glukozy. W stosunku do czasu „0” nastąpił wzrost liczby bakterii o 2 rzędy logarytmiczne. Wzrost w podłożu suplementowanym pullulanem był w tym czasie wyższy tylko o 1 rząd logarytmiczny. Podobnie prezentował się wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. W przypadku *E. coli* odnotowano wzrost liczby komórek o 2 rzędy logarytmiczne tylko w podłożu RCM, natomiast w drugim podłożu kontrolnym (RCM+G) oraz suplementowanym pullulanem był to wzrost tylko o 1 rząd logarytmiczny. Po 48 h hodowli zaobserwowano tendencje spadkowe w liczbie komórek *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* we wszystkich badanych podłożach, jednakże nie były to zmiany istotne statystycznie. Natomiast populacja *E. coli* wykazywała wzrost jedynie w hodowli w podłożu kontrolnym RCM. Nie zaobserwowano obecności żywych komórek bakterii w rozcieńczeniu  $R=10^{-1}$ , zarówno w podłożu z dodatkiem glukozy jak też suplementowanym pullulanem.

Wpływ pullulanu na populacje bakterii kałowych badali Yoneyama i wsp. [1990]. Stwierdzono, że pullulan nie miał istotnego wpływu na liczbę mikroorganizmów w przeliczeniu na gram kału, przed i po spożyciu pullulanu przez ochotników, natomiast istotnie wpłynął na zmianę spektrum kałowej flory bakteryjnej w 5 z 6 badanych próbek kału, w kierunku stymulacji komórek rodzaju *Bifidobacterium*. Podobnych obserwacji dokonali Matteuzzi i wsp. [2004] badając właściwości prebiotyczne preparatu przygotowanego z kielków pszenicy. Autorzy stwierdzili, że zawarte w preparacie nietrawione cukry, tj. rafinoza i inne polisacharydy były fermentowane przez mikroorganizmy jelitowe i modyfikowały mikroflorę okrężnicy, obniżając poziom niektórych Gram-ujemnych bakterii, zwłaszcza bakterii z grupy coli, oraz zwiększały liczbę bifidobakterii i bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Fermentacja oligo- i polisacharydów w okrężnicy jest wynikiem złożonej aktywności metabolicznej mikroflory jelitowej [Pompei i wsp. 2008]. Jak donoszą Simpson & Campbell [2015] działanie stosowanych powszechnie prebiotyków (szczególnie FOS i GOS) w obrębie mikroflory jelitowej prawdopodobnie wpływa na zwiększenie liczby bifidobakterii. Większość pierwszych stosowanych prebiotyków oceniono u ludzi i wykazano, że komercyjnie stymulują one bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i specyficznie *Bifidobacterium*, ale nie są wykorzystywane przez patogeny jak niektóre clostridia i *Escherichia coli* [Depeint i wsp. 2008; Roberfroid i wsp. 2010].

W celu wykazania zdolności fermentacji pullulanu przez bakterie pochodzące z okrężnicy sprawdzono zmiany pH i kwasowości ogólnej hodowli bakterii kałowych w warunkach *in vitro* w czasie 48h. Uzyskane wyniki wskazują na istotne obniżenie wartości pH w podłożu z pullulanem i glukozą o ok. 2 jednostki po 24 i 48h hodowli. Zmiany kwasowości ogólnej hodowli mikroflory kałowej również potwierdziły lepszą fermentację pullulanu niż glukozy czy glukozy w połączeniu ze skrobią w podłożu RCM. Cukry zawarte w kontrolnym podłożu RCM były fermentowane tylko w pierwszych 24h, natomiast pullulan i glukoza jeszcze w kolejnej dobie. Wydłużenie logarytmicznej fazy wzrostu do 36h hodowli i związane z tym przedłużenie aktywności metabolicznej obserwowano również

w badaniach modelowych w przypadku niektórych szczepów *Lactobacillus* (H1). Ostatecznie, po 48h hodowli bakterii kałowych, kwasowość ogólna zwiększyła się w podłożu z pullulanem do 1,48 g / 100 ml, a w podłożu z glukozą do 1,10 g / 100 ml w przeliczeniu na kwas mlekowy.

W przeprowadzonych badaniach nie obserwowalam istotnego wzrostu bakterii *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* w obecności pullulanu, jednak zmniejszenie wartości pH i wzrost kwasowości ogólnej hodowli kałowych sugeruje podwyższenie aktywności fermentacyjnej korzystnej mikroflory. Niższa wartość pH jest związana z wytwarzaniem przez mikroflorę kałową krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (H2). Oprócz kwasu mlekowego, niektóre bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wytwarzają kwas octowy, a także nadtlenuk wodoru. Metabolity te tworzą mniej korzystne środowisko dla wzrostu *in vitro* potencjalnie patogennych mikroorganizmów. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* (wraz z *Lactobacillus*) podczas fermentacji glukozy wytwarzają duże ilości kwasu octowego i mlekowego (teoretycznie w stosunku molowym 3:2), co powoduje zmniejszenie wartości pH i wpływa hamująco na bakterie gnilne, w tym także na bakterie z grupy coli [Nowak i wsp. 2010.]. Obserwowany w badaniach wysoki poziom kwasowości ogólnej mógł być przyczyną zahamowania wzrostu *E. coli* w podłożu z pullulanem lub glukozą. Zwiększone ilości kwasu mlekowego i octowego podczas hodowli modelowych wybranych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w podłożu z pullulanem zaobserwowałam także we wcześniejszych badaniach (H1,H2). Badaniem zmian wartości pH podczas hodowli drobnoustrojów kałowych wyizolowanych z próbek kału zajmowali się także inni badacze, poddając fermentacji inulinę pochodzącą z cykorii oraz karczochów [López-Molina i wsp. 2005], fruktooligosacharydy Pompei i wsp. [2008] czy polisacharydy z nasion *Plantago asiatica* L. [Hu i wsp. 2013]. Stwierdzili oni różne zmiany pH podłoża hodowlanych zawierających te sacharydy w czasie 24 godzinnych hodowli. W hodowli z dodatkiem inuliny z cykorii, wartość pH podłoża obniżyła się istotnie o 3 jednostki, natomiast z inuliną z karczocha o 2 jednostki. Wzrost bakterii kałowych w podłożu z fruktooligosacharydami spowodował w tym samym czasie obniżenie pH o 2,1 jednostki, a przy zastosowaniu polisacharydów z nasion *Plantago asiatica* L tylko o 1 jednostkę.

Reasumując otrzymane wyniki można stwierdzić, że pullulan miał selektywny wpływ na naturalną mikroflorę okrężnicy. W hodowli z pullulanem jako jedynym źródłem węgla nie obserwowano większego wzrostu liczby bakterii z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* w porównaniu z podłożami kontrolnymi, natomiast stwierdzono ich zwiększoną aktywność fermentacyjną, która wpłynęła na zahamowanie wzrostu *Escherichia coli*.

#### **4.3.5. Wykazanie korzystnego wpływu dodatku pullulanu na cechy fizykochemiczne jogurtów naturalnych i przeżywalność LAB podczas ich chłodniczego przechowywania oraz akceptowalności konsumenckiej wytworzonych jogurtów naturalnych**

Jogurt to dobrze funkcjonujący produkt mleczarski znany ze swoich właściwości odżywczych. Jego jakość i akceptacja konsumenta są w znacznym stopniu zdeterminowane przez właściwości fizyczne jogurtu, takie jak tekstura, stabilność wobec separacji surowicy i konsystencja [Lee & Lucey 2010]. Fizyczne cechy jogurtu są w dużej mierze wynikiem warunków prowadzenia procesu (obróbka cieplna mleka, fermentacja, czas i temperatura, ustawienia parametrów chłodzenia) jak również dodatku różnych składników, (jak białka mleka, stabilizatory, minerały lub prebiotyki) włączane do jogurtów w celach technologicznych, funkcjonalnych lub odżywczych [Lee & Lucey 2010; Zare i wsp. 2011]. W celu poprawy tekstury i stabilności jogurtu, modyfikacji konsystencji i wzmocnienia stabilności podczas przechowywania stosowane są różne polisacharydy, jak karagen, skrobia, pektyny, pochodne metylocelulozy, alginian, guma świętojańska, ksantan czy guma guar [Everett & McLeod 2005; Lee & Chang 2016], a także niektóre promujące zdrowie składniki, jak  $\beta$ -glukan [Lazaridou i wsp. 2008; Singh i wsp. 2012; Lazaridou i wsp. 2014] lub inuliny [Debon i wsp. 2010, De Souza Oliveira i wsp. 2011]. Dużo uwagi poświęca się także neutralnym polisacharydom wytwarzanym na drodze mikrobiologicznej, które w produktach mlecznych mogą zastąpić substancje pochodzenia roślinnego. Jednym z nich jest pullulan. Pullulan jest stabilny w szerokim zakresie pH i temperatury. W układach wodnych ma tendencję do zwiększania lepkości, ale nie tworzy żeli. Współistnienie w cząsteczce pullulanu wiązań  $\alpha$ - (1-4) i  $\alpha$ - (1-6) glikozydowych sprawia, że ma on unikalne właściwości w porównaniu z innymi polisacharydami. Cząsteczka pullulanu ma zarówno charakter hydrofobowy jak też hydrofilowy. W produkcji żywności może on, m.in., być użyty jako stabilizator i spoiwo składników past spożywczych, środek poprawiający lepkość napojów, sosów i majonezów oraz częściowy zamiennik skrobi w makaronach i pieczywie [Singh i wsp. 2008; Singh i wsp. 2015]. Wykazano również, że dodatek pullulanu do produktów zawierających skrobię ryżową może hamować krótkoterminową retrogradację amylozy, jak również spowalniać i opóźniać długoterminową retrogradację amylopektyny, co sugeruje, że może on znaleźć zastosowanie w produkcji żywności jako nowy inhibitor przeciwdziałający starzeniu skrobi, czego skutkiem może być żywność o dłuższej trwałości i lepszych odczuciach w organoleptycznych [Chen i wsp. 2015]. Ze względu na wyżej wymienione właściwości pullulanu, otrzymane wcześniej wyniki badań modelowych (**H1**, **H2**), jak również brak doniesień literaturowych o próbach jego zastosowania jako składnika jogurtów skłoniły mnie do dalszych badań i postawienia kolejnej hipotezy badawczej **czy obecność pullulanu w jogurcie naturalnym wpłynie na jego cechy fizykochemiczne, przeżywalność LAB podczas chłodniczego przechowywania jogurtów oraz czy taki produkt zostanie zaakceptowany**

**przez konsumentów.** Zastosowanie pullulanu w produkcji jogurtu wydawało się interesujące, zarówno w technologicznym, jak też żywieniowym i potencjalnie prebiotycznym aspekcie.

Do wytworzenia jogurtów naturalnych wykorzystałam kulturę jogurtową Yo-180 Yo-Flex zawierającą bakterie *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* i *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Ch. Hansen, Polska) oraz pullulan (Carbosynth Limited Co., UK). Jogurt kontrolny nie zawierał pullulanu, natomiast jogurty doświadczalne wytworzono dodając do przygotowanej wcześniej porcji mleka odpowiednio 1 lub 2% (w/w) pullulanu. Po wprowadzeniu inokulum bakterii każdy rodzaj jogurtu rozlewano do szklanych słoików o objętości 180 ml (**H4**) oraz 400 ml (**H5**) i inkubowano w 44°C aż wartość pH osiągnęła 4,6. Przerwywano fermentację przez schłodzenie jogurtów w łaźni wodnej a następnie umieszczano je w chłodni o temperaturze 4°C i przechowywano przez 28 dni. Analizę właściwości fizykochemicznych jogurtów (zawartość ciał stałych (TS) oraz tłuszczu i białka) przeprowadzono na próbkach jogurtu 1 dzień po wytworzeniu według AOAC [2007] (**H4**). Zmiany w liczbie bakterii jogurtowych i zmiany pH (**H4**, **H5**) oraz kwasowości miareczkowej i analizę sensoryczną (**H5**) przeprowadzono bezpośrednio po wytworzeniu jogurtów oraz po 7, 14, 21 i 28 dniach chłodniczego przechowywania. Podczas całego okresu przechowywania jogurtów badano także ich właściwości reologiczne, zmiany tekstury (lepkość, twardość), podatność na synerезę (**H4**).

Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia pullulanu w jogurcie rosła również wartość TS, podczas gdy zawartość tłuszczu i białka pozostała niezmienną. Podobne obserwacje odnotowali inni autorzy włączający do jogurtu funkcjonalne składniki żywności, takie jak inulina [Guggisberg i wsp. 2009, De Souza Oliveira i wsp. 2009, Debon i wsp. 2010], oligofruktozy [Castro i wsp. 2008] lub mąkę z soczewicy [Zare i wsp. 2011]. Badania zmian pH wykazały, że suplementacja jogurtów pullulanem, jak również okres przechowywania wpłynęły na zmniejszenie wartości pH wszystkich badanych próbek. Początkowe średnie pH próbki kontrolnej wynosiło 4,45 i zmniejszyło się w ostatnim dniu przechowywania do 4,35. Początkowe średnie odczyty pH dla jogurtów suplementowanych 1 i 2% pullulanu wynosiły odpowiednio 4,45 i 4,46 a pod koniec okresu przechowywania ich wartości pH obniżyły się odpowiednio do 4,30 i 4,27 (**H4**). Podobne wyniki wartości początkowego pH jogurtu kontrolnego oraz z dodatkiem 1 i 2% pullulanu uzyskałam również w kolejnych badaniach. Wynosiły one odpowiednio 4,53 i 4,51. Po 28 dniach chłodniczego przechowywania wartość pH obniżyła się odpowiednio do 4,3; 4,24 oraz 4,26 (**H5**). Warto zauważyć, że zmiany pH podczas przechowywania jogurtów wzbogaconych pullulanem były większe niż obserwowane w próbce kontrolnej. Mogło to być związane z nieco mniejszą zdolnością buforowania jogurtów suplementowanych pullulanem w porównaniu z jogurtem kontrolnym. Z drugiej strony, może to też sugerować lepszą aktywność fermentacyjną jogurtowych kultur starterowych

w obecności pullulanu. Mogą o tym świadczyć również uzyskane wyniki zmian kwasowości miareczkowej jogurtów. Wykazałam niewielki wzrost tego parametru podczas chłodniczego przechowywania próbek jogurtów przez 28 dni. Kwasowość jogurtu kontrolnego wzrosła o 6° SH, jogurtu z dodatkiem 1% pullulanu o 6,72° SH a jogurtu z dodatkiem 2% pullulanu o 6,16° SH. Zauważyłam także różnice w uzyskanych wartościach kwasowości miareczkowej bezpośrednio po wytworzeniu jogurtów. Wynosiły one 0,66 – 1,98° SH. Jogurt z dodatkiem 2% pullulanu wykazywał istotnie większą kwasowość niż jogurt kontrolny i jogurt z dodatkiem 1% pullulanu. Przeprowadzone przeze mnie wcześniejsze badania (**H1**, **H2**) wykazały lepszy wzrost i aktywność kultury *L. acidophilus* CH-5 w pożywce MRS wzbogaconej o 2% pullulanu i 2% glukozy w porównaniu z próbą kontrolną, którą było standardowe podłoże MRS. W tym badaniu kwasowość podłoża MRS wzbogaconego w pullulan i fermentowanego przez *L. acidophilus* CH-5 również była wyższa niż w próbce kontrolnej.

W wytworzonych jogurtach (**H5**) oznaczyłam także zmiany liczby bakterii kultury jogurtowej użytej do fermentacji podczas przechowywania w temperaturze chłodniczej 4°C, z wykorzystaniem metody płytkowej zgodnie z normą ISO Standard [ISO 7889:2003]. Do oznaczenia liczby bakterii *Lactobacillus* zastosowałam nieselektywne podłoże MRS agar (BTL, Polska). Płytki inkubowano w 45°C przez 72h w warunkach beztlenowych, z zastosowaniem wkładów Genbox anaer (BioMerieux, Francja). Liczbę bakterii *Streptococcus thermophilus* oznaczałam na podłożu M17 agar (BTL, Polska). Płytki inkubowano w 37°C przez 72h w warunkach tlenowych.

Liczba bakterii *Streptococcus thermophilus* w jogurcie kontrolnym obniżyła się po 28 dniach przechowywania o 0,3 jednostki logarytmicznej. W tym samym czasie liczba tych bakterii w jogurtach z 1 i 2% pullulanu zmieniła się odpowiednio o 0,07 i 0,1 jednostki logarytmicznej. Z kolei oznaczona suma bakterii *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* i *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* zmalała w próbce kontrolnej o 1,24 log jtk/g, w jogurcie z dodatkiem 1% pullulanu o 0,07 log jtk/g i o 0,05 log jtk/g przy dodatku pullulanu 2%. Otrzymane wyniki mogą sugerować, że dodatek pullulanu wpłynął ochronnie na przeżywalność LAB podczas chłodniczego przechowywania jogurtów. Z danych literaturowych wynika, że stosunek liczbowy ziarniaków do pałeczek w typowym jogurcie powinien być zbliżony do 1:1. Utrzymanie właściwych proporcji między bakteriami ma wpływ na trwałość, cechy organoleptyczne oraz aspekty prozdrowotne jogurtu. Przechowywanie jogurtów w warunkach chłodniczych powoduje jednak znacznie szybsze zmniejszenie się liczby żywych komórek *Lactobacillus* niż *Streptococcus thermophilus* [Kycia i Krysiński, 2014].

Brak dostępnej literatury o wpływie dodatku pullulanu na właściwości jogurtów nie daje możliwości przedyskutowania otrzymanych wyników własnych. Prowadzone przez Singh i wsp. [2012] badania nad wpływem  $\beta$ -glukanu uzyskanego z owsa i wprowadzonego do jogurtu w stężeniu 0,4 i 0,5% wykazały opóźnienie fermentacji laktozy w początkowych etapach produkcji jogurtu.

Wiadomo, że kwasowość jogurtu jest związana z fermentacją laktozy przez bakterie kwasu mlekowego, więc wartości pH zmniejszają się podczas przechowywania jako wynik metabolicznej aktywności starterów. Obserwowany efekt większej redukcji pH podczas przechowywania jogurtów suplementowanych różnymi potencjalnymi związkami prebiotycznymi zauważył wcześniej *Zare i wsp. [2011]*. Zmiany pH po 28-dniowym okresie przechowywania były nieco większe w próbkach jogurtów z 1 i 2% dodatkiem mączek z soczewicy w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Również *Rezaei i wsp. [2012]* zaobserwowali niższe pH i wyższą kwasowość w zamrożonym jogurcie zawierającym dodatek 2% inuliny. Podobny efekt został wykazany przez *De Scuja Oliveira i wsp. [2009]*, który stwierdził silniejsze zakwaszenie w mleku suplementowanym 0,04% inuliny i fermentowanym mieszaną kulturą *S. thermophilus* i *L. bulgaricus* lub *S. thermophilus* i *L. acidophilus*.

Analizę sensoryczną wykonano metodą ilościowej Analizy Opisowej [QDA; ISO 13299.2:1998] bezpośrednio po zakończeniu procesu fermentacji (dzień 0), a następnie w 7, 14, 21 i 28 dniu przechowywania chłodniczego (**H5**). Wyróżniki sensoryczne zostały wybrane i zdefiniowane w dyskusji panelowej przez 16 osobowy zespół oceniających. Wybrano 5 wyróżników zapachu (mleczny, sterylizacyjny, słodki, drażniący, inny), 9 wyróżników smaku (mleczny, sterylizacyjny, kwaśny, słodki, słony, gorzki, mączny, drażniący, inny) oraz wyróżniki, takie jak: ton barwy, gęstość, gładkość i lepkość. Następnie określono jakość ogólną jogurtów w skali 0-10.

Na podstawie uzyskanych profili smaku i aromatu jogurtów testowanych bezpośrednio po procesie fermentacji, próbkę kontrolną charakteryzowała najlepsza ogólna jakość (7,49 j.u.). Jogurt bez dodatku pullulanu charakteryzował się niską oceną wyróżników sensorycznych, odbieranych jako odczucia negatywne podczas próbowania produktu. Na jakość ogólną badanego jogurtu istotny pozytywny wpływ miała też intensywność odczuwania smaku kwaśnego. Jogurt kontrolny miał najbardziej białą barwę, a pod względem tekstury oceniano go jako produkt najgładszy, najmniej gęsty i lepki.

Jogurt z dodatkiem 1% pullulanu uzyskał wyższą ocenę jakości ogólnej niż jogurt z dodatkiem 2% (odpowiednio 6,96 j.u. i 5,46 j.u.). Ogólna jakość tego produktu była porównywalna z jakością próbki kontrolnej. Na ogólne wrażenie sensoryczne znaczący wpływ miała niska intensywność cech negatywnych, w tym zapachu i smaku sterylizacji. Na niską ocenę jogurtu z dodatkiem 2% pullulanu silnie wpłynęły takie cechy, jak najbardziej wyraźna „piaszczysta” tekstura, posmak sterylizacji i smak mączny. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ogólną jakością jogurtu kontrolnego a jogurtem z dodatkiem pullulanu 1% (średnia ocena to 7 j.u.) po 14 i 28 dniach chłodniczego przechowywania. Jogurt z dodatkiem pululanu 2% ponownie uzyskał najniższy wynik. Jogurt ten był zbyt gęsty, miał „piaszczystą” konsystencję, z zauważalnym sterylizującym, gorzkim i mączystym posmakiem oraz najbardziej żółtawo-kremowym kolorem. Można



zatem stwierdzić, że dodanie 2% pullulanu do jogurtu było zbyt wysokie z punktu widzenia jakości sensorycznej.

Analiza reologiczna jogurtów (**H4**) wykazała, że wszystkie próbki, niezależnie od składu wykazywały nienewtonowskie zjawisko przepływu, jednakże było ono znacznie mniejsze w próbkach jogurtów suplementowanych pullulanem. Zaobserwowano także bardzo niskie zakresy prędkości ścinania i różnice w wartościach współczynnika  $\eta_{app}$  między wszystkimi próbkami. Uzyskane wartości współczynnika  $\eta_{app}$  przy szybkości ścinania 10/s wynosiły 0,67, 0,45 i 1,07 Pa odpowiednio dla kontroli i próbek z 1 i 2% pullulanu. Wraz ze wzrostem stref ścinania różnice w wartościach współczynnika  $\eta_{app}$  pomiędzy kontrolą a próbką z 1% pullulanu nie były już znaczące, Początkowe niższe wartości współczynnika  $\eta_{app}$  odnotowane w jogurcie z dodatkiem 1% pullulanu w porównaniu z jogurtem kontrolnym mogły być skutkiem słabszego wiązania i tworzenia struktury skrzepu. Szybsze zakłócenie agregatów białkowych w jogurcie uzupełnionym 1% pullulanu może też sugerować, że jego włączenie do mleka w takiej ilości zmniejsza wytrzymałość sieci cząstek miceli kazeinowych. Takiego zjawiska nie zaobserwowano w jogurtach suplementowanych 2% pullulanu, co być może miało związek z wyższą zawartością ciał stałych (TS) lub może wskazywać, że pullulan jest nieadsorbującym polisacharydem, jak zaproponował *Lazaridou i wsp. [2008]* dla neutralnych  $\beta$ -glukanów zbóż. Zmniejszenie współczynnika  $\eta_{app}$  jogurtu wraz ze zwiększeniem szybkości ścinania zostało już wcześniej zauważone przez innych badaczy [*Gauche i wsp. 2009, Debon i wsp. 2010*], ale nie zajmowali się oni fermentowanym mlekiem z dodatkiem pullulanu. Według *Corredig i wsp. [2011]*, interakcje polisacharyd-białko w medium takim jak mleko mają różny charakter w zależności od rodzaju polimeru, stężenia polisacharydu i warunków środowiska.

Badanie twardości i lepkości wytworzonych jogurtów wykazało, że w pierwszym dniu po produkcji różnice między jogurtem kontrolnym i wzbogaconym 1% pullulanu nie były statystycznie istotne, natomiast jogurt z dodatkiem 2% pullulanu charakteryzował się największą twardością. Podczas 28 dni przechowywania twardość wszystkich próbek wzrosła, ale nadal największą twardość wykazywał jogurt z dodatkiem 2% pullulanu. Zjawisko takie jest typowe dla powstałego żelu jogurtowego, ponieważ podczas przechowywania sieć cząstek ulega przegrupowaniu, co prowadzi do zwiększenia liczby więzi między cząstkami, a tym samym powoduje zwiększenie jędrności. Twardość jogurtu zależy od wielu czynników, takich jak zawartość TS i białka, pH, stopnia homogenizacji i obróbki cieplnej mleka, warunków inkubacji i temperatury chłodzenia *Lee & Lucey [2010]*. W tym przeprowadzonym badaniu twardość jogurtu z dodatkiem 1% pullulanu była podobna do próbki kontrolnej, mimo wyższej zawartości TS. Wyniki te wydają się być spójne z uzyskanymi z pomiarów reologicznych co sugeruje, że dodatek 1% pullulanu jest za niski i powoduje osłabienie struktury żelu. Z drugiej strony wiadomo też, że niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego mogą syntetyzować zewnątrzkomórkowe polisacharydy

(EPS), które prawdopodobnie poprzez interakcje białko-białko mogą osłabiać kwaśny skrzep mleczny [Vlahopoulou & Bell 1995].

Biorąc pod uwagę wpływ dodatku pullulanu i czasu przechowywania na lepkość jogurtów zaobserwowano, że wzbogacenie pullulanem, niezależnie od dawki, przyczyniło się do wyraźnego zwiększenia lepkości jogurtu. Z kolei podatność na synerezę była istotnie wyższa przy zawartości 1% pullulanu a niższa przy dawce 2%. Początkowa średnia objętość wydalanej serwatki dla kontroli i próbek z 1 i 2% pullulanu wynosiła odpowiednio 15, 52 i 7%, co wskazuje na najniższy poziom synerezy przy 2% dodatku polisacharydu. Podczas przechowywania objętość oddzielonej serwatki systematycznie wzrastała. Po 28 dniach wynosiła ona 27, 61 i 26% odpowiednio dla kontroli, próbki z 1 i 2% pullulanu. Próbką z dodatkiem 2% pullulanu miała najniższy poziom separacji serwatki podczas całego okresu przechowywania. Tendencje obserwowane w przypadku podatności jogurtu na synerezę są zgodne z wynikami tekstury i pomiarami przepływu. Jogurt o większej twardości jest mniej podatny na przegrupowania w ramach swojej sieci i w związku z tym wykazuje mniejszą skłonność do kurczenia się i wydalania serwatki [Brennan & Tudorica 2008].

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że dodatek pullulanu do jogurtu może spowodować poprawę lub pogorszenie stabilności i tekstury fermentowanego mleka a właściwości fizykochemiczne jogurtu wzbogaconego w pullulan są w dużej mierze zdeterminowane przez zastosowane stężenie polisacharydu w jogurcie. Włączenie pullulanu w stężeniu 1% prawdopodobnie było zbyt niskie, co miało wpływ na tworzenie ciągłej sieci kazein podczas żelowania, prowadząc do słabszego wiązania między białkami mleka oraz skutkowało niższą początkową wartością lepkości i wysoką synerezą w porównaniu z próbą kontrolną. Dodanie pullulanu w wyższym stężeniu (2%) znacząco poprawiło stabilność produktu, zwiększając jędrność i lepkość żelu, a także redukując zakres oddzielania serwatki. Czas przechowywania jogurtów we wszystkich przypadkach wpłynął na pogorszenie właściwości fizykochemicznych wszystkich badanych rodzajów jogurtów, łącznie z kontrolnym.

#### **4.3.6. Ocena możliwości zastosowania pullulanu jako substancji niskotłuszczowej w parzonych, homogenizowanych kiełbasach**

Homogenizowane kiełbasy parzone to popularne produkty mięsne dostępne na rynku europejskim, zawierające od 20 do 30% tłuszczu [Palka i wsp. 2012; Asuming-Bediako i wsp., 2014]. Obecnie w ofercie rynkowej dostępne są również homogenizowane kiełbasy parzone o zredukowanej o ok. 15% zawartości tego składnika. Zmniejszenie zawartości tłuszczu osiąga się przez modyfikację składu receptury, często polega to na zastąpieniu części surowca tłuszczowego składnikami bezmięsnymi, tj. polisacharydy stosowane samodzielnie lub w różnych kombinacjach. Ze względu na zdolność do wiązania wody, właściwości zagęszczające i żelujące, polisacharydy mają pozytywny wpływ na teksturę

i cechy sensoryczne kielbas parzonych o obniżonej zawartości tłuszczu. Dane literaturowe wskazują, że skrobia, maltodekstryna, karagen, ksantan i preparaty z błonnika mogą być stosowane w przygotowywaniu niskotłuszczowych kielbas parzonych [Lurueña-Martinez i wsp. 2004; Crehan i wsp. 2000; Cierach i wsp. 2009]. Wyniki badań wskazują, że pullulan wykazuje właściwości zagęszczające i wiążące oraz może działać jako substancja poprawiająca teksturę homogenizowanych produktów mięsnych [Cheng i wsp. 2011; Singh i wsp. 2008]. Pullulan jest substancją niskokaloryczną, 1 g dostarcza zaledwie 2,05 kcal (8,79 kJ). Jest to związane z jego dużą opornością na enzymy trawienne przewodu pokarmowego ssaków [Nakamura 1984]. Dlatego proponuje się go stosować jako składnik niskokalorycznej żywności, dietetycznych przekąsek przeznaczonych dla cukrzyków oraz zamiennik skrobi w makaronach lub pieczywie [Singh i wsp. 2008]. W związku z tym kolejnym etapem moich badań było sprawdzenie, **czy można zastosować pullulan jako zamiennik tłuszczu w homogenizowanych kielbasach parzonych oraz czy wyrób taki będzie akceptowalny sensorycznie (H6).**

Homogenizowane kielbasy parzone są produktami o krótkim okresie trwałości, charakteryzują się stosunkowo wysokim pH i aktywnością wody [Korkeala & Björkroth 1997]. Są to najważniejsze czynniki wpływające na stabilność tego produktu. Z tego względu modyfikacje składu receptury mające na celu zmniejszenie zawartości tłuszczu mogą wpływać nie tylko na właściwości fizykochemiczne i sensoryczne kielbas, ale także ich jakość mikrobiologiczną [López-López i wsp. 2009; Delgado-Pando i wsp. 2011]. Ten aspekt również uwzględniono w prowadzonych badaniach, określając wpływ pullulanu na cechy fizykochemiczne i mikrobiologiczne homogenizowanych, niskotłuszczowych kielbas z mięsa parzonego.

Do badań przygotowano cztery rodzaje homogenizowanych parzonych kielbas, które różniły się kompozycjami receptur pod względem zawartości pullulanu i wieprzowiny – K (próbka kontrolna bez dodatku pullulanu), P1 (3 porcje wieprzowiny: 1 porcja pullulanu), P2 (odpowiednio 2:2) oraz P3 (odpowiednio 1:3) Każdą oddzielną porcję kielbasek pakowano próżniowo w wielowarstwowy worek foliowy (PE / PA, grubość 75  $\mu\text{m}$ ) i przechowywano w chłodziarce ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) przez 21 dni (H6).

Oznaczenie podstawowego składu chemicznego, pomiary instrumentalne koloru i tekstury oraz sensoryczną ocenę kielbas prowadzono po 24h od ich przygotowania. Pomiary pH i aktywności wody ( $a_w$ ) wraz z analizami mikrobiologicznymi wytworzonych kielbas wykonano po 0, 3, 7, 10, 14 i 21 dniach przechowywania. Ubytek masy podczas gotowania określono dla każdej kielbasy formułą według Crehan i wsp. [2000]. Pomiar pH kielbas przeprowadzono według normy [PN-ISO 2917: 2001], aktywność wody określono w aparaturze o stałej temperaturze  $25^\circ\text{C}$  dla próbki kielbasy o grubości 3 mm. Przeprowadzono także analizę składu chemicznego, oznaczenie zawartości wody, białka i tłuszczu, zgodnie z wymaganiami AOAC [2007], pomiar koloru i tekstury oraz zawartości soli (NaCl) metodą potencjometryczną. Ocena sensoryczna kielbas została

przeprowadzona metodą skalowania przez panel składający się z 10 osób (w wieku 22-43 lata) zgodnie z normą [PN-ISO 4121: 1998]. W skali 0–5 jednostek oceniono wygląd kielbas, kolor w przekroju, zapach, smak i teksturę. Analiza mikrobiologiczna obejmowała oznaczenie ogólnej liczby żywych drobnoustrojów, liczby mikroorganizmów psychrotroficznych, liczby bakterii kwasu mlekowego, bakterii z rodziny Enterobacteriaceae oraz liczby drożdży i pleśni. Liczba mikroorganizmów została wyrażona jako  $\log_{10}$  jtk/gram ( $\log$  CFU/g) [López-López i wsp. 2009].

Wykazano, że dodatek pullulanu nie wpłynął istotnie na zwiększenie ubytku masy kielbas podczas gotowania. Uzyskane wyniki mieściły się w granicach od 6,5% dla próbki kontrolnej bez pullulanu do 7,6% dla próbki P3, zawierającej 3 porcje pullulanu. Odpowiednio dla P1 i P2 były to wartości 6,9% i 7,2%. Otrzymane wyniki były niższe od uzyskanych przez innych badaczy, którzy jako substytut tłuszczu stosowali karagen [Cierach i wsp. 2009], uwodnione płatki owsiane [Yang i wsp. 2007] czy mączkę chleba świętojańskiego i gumę ksantanową [Lurueña-Martínez i wsp. 2004]. Modyfikacja składu receptury nie miała wpływu na zawartość białka i chlorku sodu, stwierdzono jednak największą zawartość wody w kielbasach z najwyższą zawartością pullulanu (P3). Im większy był dodatek pullulanu do kielbas (próbki P2 i P3), tym mniejsza była zawartość tłuszczu (**H6**). Podobnie jak podstawowy skład chemiczny, parametry kolorów homogenizowanych parzonych kielbas w dużej mierze zależą od składu. Według García-García & Totosaus [2008] na parametry kolorów  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  kielbas o niskiej zawartości tłuszczu mogą mieć wpływ dodane składniki polisacharydowe. Badanie koloru i tekstury wykazało, że niezależnie od udziału pullulanu w składzie kielbasy nie różniły się one jasnością oraz udziałem barwy czerwonej. Wraz ze wzrostem zawartości pullulanu zaobserwowano jednak istotne różnice w udziale barwy żółtej.

Osiągnięcie odpowiedniej tekstury jest jednym z głównych problemów w przygotowywaniu kielbas parzonych ze zmniejszoną zawartością tłuszczu. Wyniki pomiarów instrumentalnych wskazują, że jeśli te produkty są przygotowywane bez użycia substytutu tłuszczu zwierzęcego, ich twardość jest wyższa w porównaniu z ich pełnotłustymi odpowiednikami. Jest to związane z wyższą zawartością białka w produkcie [Crehan i wsp. 2000]. Wprowadzenie pullulanu do składu receptury homogenizowanych parzonych kielbas wpłynęło na ich teksturę. Wraz ze wzrastającą zawartością hydrokoloidu obserwowano zmniejszenie siły ścinającej kielbas (**H6**). Ponieważ uwodniony pullulan wykazuje niską lepkość w porównaniu z innymi polisacharydami [Leathers 2003] a jego wodne roztwory są stabilne podczas ogrzewania i nie tworzą żeli [Oğuzhan & Yangilar 2013]. Jednak tekstura kielbas parzonych o niskiej zawartości tłuszczu, zawierających około 15% lub mniej, może być modyfikowana przez wprowadzenie polisacharydów do ich składu. Właściwości funkcjonalne polisacharydów, takie jak zdolność wiązania wody, wzrost lepkości i / lub właściwości żelujące oraz interakcje z innymi składnikami produktu mogą pomóc

w uzyskaniu twardej, sensorycznie pożądanej tekstury tego typu kielbas [García-García & Totosaus 2008; Cierach i wsp. 2009].

Otrzymane wyniki oceny sensorycznej pokazały, że zastosowanie pullulanu, niezależnie od jego proporcji w recepturze, nie miało istotnego wpływu na kolor lub zapach homogenizowanych parzonych kielbas, jednak negatywnie oceniono postrzeganie koloru żółtego na przekroju kielbas. Najniższą ocenę barwy uzyskała kielbasa P3, z najwyższym dodatkiem pullulanu. Pod względem innych cech jakościowych, jak ogólny wygląd, smak i konsystencja, kielbasa o najniższej proporcji pullulanu (P1) nie różniła się znacząco od próbki kontrolnej (PC), zdecydowanie gorszą ocenę pod względem wyglądu ogólnego, smaku i tekstury uzyskały kielbasy P2 i P3. Jedną z przyczyn pogorszenia smaku tych kielbas był mniej wyczuwalny smak mięsa oraz zmiany tekstury (zbyt duża miękkość oraz zbyt niska jędrność).

Pomiar pH i aktywności wody ( $a_w$ ) mają istotne znaczenie w przewidywaniu trwałości produktów mięsnych [Tilkens i wsp. 2015]. Nie zaobserwowano istotnych różnic w wartości pH kielbas kontrolnych oraz P1 bezpośrednio po przygotowaniu (odpowiednio 6,15 i 6,14) natomiast wzrost zawartości pullulanu spowodował nieznaczne obniżenie pH kielbas P2 i P3 do wartości 6,11. Po 21 dniach chłodniczego przechowywania, pH kielbas z pullulanem obniżyło się do wartości 6,02, a kielbas kontrolnych do poziomu 6,03. Średnie wartości  $a_w$  kielbas po przygotowaniu mieściły się w zakresie od 0,962 do 0,969. Kielbasy zawierające pullulan charakteryzowały się nieco wyższą początkową wartością aktywności wody w porównaniu z kielbasą kontrolną. W ostatnim dniu chłodniczego przechowywania kielbas wartość  $a_w$  wynosiła od 0,979 (dla próbki kontrolnej) do 0,98 (dla kielbasy P3). Według Tilkens i wsp. [2015] produkty mięsne o kombinacji  $\text{pH} \leq 5,1$  i  $a_w \leq 0,96$  można uznać za stabilne, nawet jeśli są przechowywane w nieschłodzonym środowisku. Otrzymane wyniki sugerują, że homogenizowane, niskotłuszczowe kielbasy z dodatkiem lub bez dodatku pullulanu nie są produktami o długim okresie trwałości.

Z przeprowadzonych analiz mikrobiologicznych wywnioskowano, że pullulan nie jest łatwo przyswajalnym źródłem węgla dla drobnoustrojów odpowiedzialnych za psucie niskotłuszczowych, homogenizowanych kielbas podczas chłodniczego przechowywania. Początkowa ogólna liczba żywych drobnoustrojów wynosiła średnio 2,86–3,00 log jtk/g, co wynikało z termicznej obróbki kielbas. Uzyskane wyniki są spójne z doniesieniami literaturowymi [Jo i wsp. 2001; Chlebowska – Śmigiel i Gniewosz 2009; López-López i wsp. 2009; Delgado-Pando i wsp. 2011;]. W ciągu 21 dni przechowywania badanych kielbas nastąpił stopniowy wzrost liczby żywych drobnoustrojów, niezależnie od ilości dodanego pullulanu, przy czym był on najniższy w próbkach kielbas P3 (0,67 log jtk/g). Podobnie kształtowały się wyniki liczby drobnoustrojów psychrotrofowych. Podczas 21 dni przechowywania w chłodni najbardziej intensywny wzrost tej grupy mikroorganizmów odnotowano w kielbasie kontrolnej (PC), a najniższy

w kielbasie P3 (**H6**). Przez cały okres przechowywania kielbas nie stwierdzono obecności LAB, bakterii z rodziny Enterobacteriaceae, drożdży i pleśni. Liczba tych mikroorganizmów była mniejsza niż 1 log jtk/g. Potwierdza to stabilna wartość pH w kielbasach z pullulanem (P2 i P3) podczas 21 dni przechowywania. Prawdopodobnie było to wynikiem procesu przygotowania kielbas (obróbki cieplnej, zastosowania osłonek) oraz próżniowego pakowania i przechowywania w chłodni.

Podsumowując, zastąpienie pullulanem części wsadu surowca mięsnego w produkcji pozwoliło na uzyskanie niskotłuszczowych, homogenizowanych kielbas parzonych o parametrach fizykochemicznych, mikrobiologicznych i sensorycznych porównywalnych z próbkami kielbas wytworzonych według standardowej receptury. Otrzymane produkty charakteryzowały się niską utratą masy podczas gotowania, stabilnym pH i niewielkimi zmianami aktywności wody podczas 21 dni chłodniczego przechowywania. Substytucja wsadu pullulanem w proporcji 2:2 lub 3:1 wpłynęła negatywnie na teksturę kielbas, jej jędrność, wzmocnienie barwy żółtej na przekroju plastra oraz na ogólną jakość sensoryczną. Zastosowanie pullulanu nie pogorszyło jakości mikrobiologicznej przechowywanych kielbas, wręcz przeciwnie, im wyższy był dodatek pullulanu tym produkt był bardziej stabilny mikrobiologicznie. Wyniki oceny sensorycznej wykazały jednak, że tylko kielbasa, w której zastosowano dodatek pullulanu w ilości  $\frac{1}{4}$  wsadu surowca mięsnego nie różniła się znacząco od kielbasy kontrolnej pod względem każdego z ocenianych atrybutów. W związku z tym można wnioskować, że w parzonych kielbasach z określoną recepturą, nie więcej niż  $\frac{1}{4}$  surowców mięsnych może być zastąpiona pullulanem.

**Za najważniejsze osiągnięcia opisanych badań zawartych w jednotematycznym cyklu publikacji uważam wykazanie, że:**

1. Bakterie kwasu mlekowego mogą wykorzystywać pullulan jako źródło węgla i metabolizować go obok glukozy z wytworzeniem kwasu mlekowego, octowego i propionowego. Jest to cecha zależna od użytego szczepu LAB.
2. Mikroflora kałowa niemowląt karmionych naturalnie jest zdolna wykorzystywać pullulan jako jedyne źródło węgla i zwiększać swoją aktywność fermentacyjną, co skutkowało zahamowaniem wzrostu *Escherichia coli*.
3. Zastosowanie pullulanu jako składnika jogurtów zwiększa przeżywalność stosowanej kultury starterowej, a jego ilość istotnie kreuje cechy fizykochemiczne i sensoryczne przechowywanych produktów.
4. Jogurty z dodatkiem 1% pullulanu, mimo mniejszej lepkości, zwiększonej synerезy oraz słabszej struktury żelu uzyskały lepszą ocenę sensoryczną. Uzasadnia to zastosowanie tej ilości pullulanu w praktyce produkcyjnej.
5. Możliwe jest uzyskanie niskotłuszczowych, homogenizowanych kielbas parzonych, o dobrych parametrach fizykochemicznych i mikrobiologicznych,

akceptowalnych sensorycznie przy zastąpieniu pullulanem nie więcej niż  $\frac{1}{4}$  wsadu surowca mięsnego.

6. Pullulan może znaleźć zastosowanie w przetwórstwie żywności jako substancja dodatkowa o potencjalnie prebiotycznych właściwościach, które wymagają dalszych badań.

### Cytowana literatura

1. Alander M., Matt J., Kneifel W., Johansson M., Kogler B., Crittenden R., Mattila-Sandholm T., Saarela M., 2001: Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 11, 817–825.
2. Arnoldi A., 2004: Functional Foods. Cardiovascular Disease and Diabetes. 1<sup>st</sup>.Edition. *Woodhead Publishing in Food Science and Technology*, 450-451.
3. Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), 2007: Official Methods of Analysis (W. Horowitz, Ed., 18th ed.). Gaithersburg, MD: USA.
4. Asuming-Bediako N., Jaspal M.H., Hallett K., Bayntun J., Baker A. & Sheard P.R., 2014: Effects of replacing pork backfat with emulsified vegetable oil on fatty acid composition and quality of UK-style sausages. *Meat Science*, 96, 187–194.
5. Brennan C. S. & Tudorica C. M., 2008: Carbohydrate-based fat replacers in the modification of the rheological, textural and sensory quality of yoghurt: comparative study of the utilization of barley beta-glucan, guar gum and inulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 824–833.
6. Bryan W., Keith W., Garleb A., Choe Y.S., Humphrey P.M., Maki K.C., 2003: Human nutrition and metabolism pullulan is a slowly digested carbohydrate in humans. *Journal of Nutrition*, 133, 1051-1055.
7. Butel M.J., 2014: Probiotics, gut microbiota and health. General review. *Médecine et maladies infectieuses*, 44(1),1–8.
8. Castro F.P., Cunha T.M., Barreto P.L.M., Amboni R.D.M.C. & Prudencio E.S., 2008: Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 74–82.
9. Charalampopoulos D., Rastall R. A., 2012: Prebiotics in foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 187-191.
10. Chen L., Ren F., Zhang Z., Tong Q. & Rashed M.M.A., 2015: Effect of pullulan on the short-term and long-term retrogradation of rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 115, 415–421.
11. Cheng K.-C., Demirci A. & Catchmark J.M.. 2011.: Pullulan: Biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 29–44.
12. Chlebowska – Śmigiel A., Gniewosz M., 2009: Effect of pullulan coating on inhibition of chosen microorganisms growth. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 8 (3), 37-46.

13. Cierach M., Modzelewska-Kapituła M. & Szaciło K., 2009: The influence of carrageenan on the properties of low-fat frankfurters. *Meat Science*, 82, 295–299.
14. Cieślík E., Gębusia A., 2011: Żywność funkcjonalna z dodatkiem fruktanów. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 2,(75), 27-37.
15. Corredig M., Sharafbafi N. & Kristo E., 2011: Polysaccharide–protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocolloids*, 25, 1833–1841.
16. Crehan C.M., Hughes E., Troy D.J. & Buckley D.J., 2000: Effects of fat level and maltodextrin on the functional properties of frankfurters formulated with 5, 12 and 30% fat. *Meat Science*, 55, 463–469.
17. Cummings J.H. & Macfarlane G.T., 2002: Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87, Suppl. 2, 145–151,
18. De Souza Oliveira R.P., Perego P., Converti A. & Oliveira M.N., 2009: The effect of inulin as a prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milk. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 195–203.
19. De Souza Oliveira R.P., Perego P., Oliveira M.N. & Converti A., 2011: Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering*, 107, 36–40.
20. Debon J., Prudencio E.S. & Petrus J.C.C., 2010: Rheological and physico-chemical characterization of prebiotic microfiltered fermented milk. *Journal of Food Engineering*, 99, 128–135.
21. Delgado-Pando G., Cofrades S., Ruiz-Capillas C., Solas M.T., Triki M. & Jiménez-Colmenero F., 2011: Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Science*, 89, 65–71.
22. Depeint F., Tzortzis G., Vulevic J., l'Anson K. & Gibson G. R., 2008: Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 785–791.
23. Domań-Pytka M., Bardowski J., 2004: Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 107-121.
24. Everett D.W. & McLeod R.E., 2005: Interactions of polysaccharide stabilizers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 15, 1175-1183.
25. Forsgren E., Olofsson T.C., Vásquez A., Fries I., 2010: Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41(1), 99-108.
26. García-García E. & Totosaus A., 2008: Low-fat sodium-reduced sausages: Effect of the interaction between locust bean gum, potato starch and κ-carrageenan by a mixture design approach. *Meat Science*, 78, 406–413.



27. Gauche C., Tomazi T., Barreto P.L.M., Ogliari P.J. & Bordignon-Luiz M.T., 2009: Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 239–243.
28. Ghoddusi H.B., Grandison M.A., Grandison A.S., Tuohy K.M., 2007: In vitro study on gas generation and prebiotic effects of some carbohydrates and their mixtures. *Anaerobe*, 13, 193-199.
29. Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scott K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D., Verbeke K. & Reid G., 2017: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY*, 14, 491-501.
30. Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995: Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.
31. Gniewosz M., 2009: Pullulan – nowy dodatek do żywności. *Przemysł Spożywczy*, 5 (63), 24–27.
32. Gniewosz M., Duszkiewicz-Reinhard W., 2008: Comparative studies on pullulan synthesis, melanin synthesis and morphology of white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 and parent strain A.p.-3. *Carbohydrate Polymers* 72, 431–438.
33. Guggisberg D., Cuthbert-Steven J., Piccinali P., Bütikofer U. & Eberhard P., 2009: Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal*, 19, 107–115.
34. Gustaw W., Kordowska-Wiater M., Koziół J., 2011: The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yogurt production. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 10(4), 455-466.
35. Hernandez-Hernandez O., Muthaiyan A., Moreno F.J., Montilla A., Sanz M.L., Ricke S.C., 2012: Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 30, 355-361.
36. Holzapfel W.H., Schillinger U., 2001: Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109-116.
37. Hopkins M.J., Sharp R., Macfarlane G.T., 2002: Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Disease*, 34 (Suppl. 2), 12-18.
38. Hu J-L., Nie S-P., Min F-F., Xie M-Y., 2013: In vitro fermentation of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. by human fecal microbiota. *Food Hydrocolloids*, 33, 384-392.
39. ISO 7889:2003. Yogurt – Enumeration of characteristic microorganisms. Colony-count technique at 37°C.
40. Jałosińska M., 2007: Przeżywalność szczepu probiotycznego w napoju bananowo-mlecznym w zależności od dodatku różnych prebiotyków. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 6 (55), 127 – 137.

41. Jo C., Lee J.W., Lee K.H. & Byun M.W., 2001: Quality properties of pork sausage prepared with water-soluble chitosan oligomer. *Meat Science*, 59, 369–375.
42. Kimoto T., Shibuya T., Shiobara S., 1997: Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 323–329.
43. Korkeala H.J. & Björkroth K.J., 1997: Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *Journal of Food Protection*, 60, 724–731.
44. Kycia K., Krysiński C., 2014: Jakość mikrobiologiczna i higieniczna rynkowych jogurtów z mleka koziego w kontekście ich właściwości terapeutycznych. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 95 (1), 186 – 191.
45. Lazaridou A., Serafeimidou A., Biliaderis C.G., Moschakis T. & Tzanetakis N., 2014: Structure development and acidification kinetics in fermented milk containing oat  $\beta$ -glucan, a yogurt culture and a probiotic strain. *Food Hydrocolloids*, 39, 204–214.
46. Lazaridou A., Vaikousi H. & Biliaderis C.G., 2008: Impact of mixedlinkage (1-3, 1-4)  $\beta$ -glucans on physical properties of acid-set skim milk gels. *International Dairy Journal*, 18, 312–322.
47. Leathers, T.D., 2003: Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 468–473.
48. Lee W.J. & Lucey J.A., 2010: Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23, 1127–1136.
49. Lee Y. & Chang Y.H., 2016: Influence of guar gum addition on physicochemical, microbial, rheological and sensory properties of stirred yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 356–363.
50. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., 2008: Mikrobiologia techniczna tom II. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa, 25-59.
51. López-López I., Cofrades S. & Jiménez-Colmenero F., 2009: Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science*, 83, 148–154.
52. López-Molina D., Navarro-Martínez M.D., Melgarejo F.R., Hiner A.N.P., Chazarra S., Rodríguez-López J.N., 2005: Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry*, 66, 1476-1484.
53. Lurueña-Martínez M.A., Vivar-Quintana A.M. & Revilla I., 2004: Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters. *Meat Science*, 68, 383–389.
54. Mäkeläinen H., Saarinen M., Stowell J., Rautonen N., & Ouwehand A.C., 2010: Xylo-oligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures. *Beneficial Microbes*, 1(2): 139-148.

55. Matteuzzi D., Swennen E., Rossi M., Hartman T., Lebet V., 2004: Prebiotic effects of a wheat germ preparation in human healthy subjects. *Food Microbiology*, 21, 119–124.
56. Mitsuhashi M., Yoneyama M., Sakai S., 1990: Growth promoting agent for bacteria containing pullulan with or without dextran. *European Patent Specification*, EP 0 382 355 B1.
57. Mroczyńska M., Libudzisz Z., Gałęcka M., Szachta P., 2011: Mikroorganizmy jelitowe człowieka i ich aktywność metaboliczna. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 6(4), 1-7.
58. Nakamura S., 1984: Pullulan. *Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan*, 42, 584–588.
59. Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z., 2010: Probiotyki – Historia i mechanizmy działania. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(71), 5-19.
60. Oğuzhan P. & Yangılar F., 2013: Pullulan: Production and usage in food industry. *African Journal of Food Science and Technology*, 4(3), 57–63.
61. Okada K., Yoneyama M., Mandai T., Aga H., Sakai S. & Ichikawa, T., 1990: Digestion and fermentation of pullulan. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 43, 23- 29.
62. Palka K., Węsierska E., Niwecka A., 2012: Jakość parówek dostępnych w sprzedaży detalicznej. *Przemysł Spożywczy*, 66(3), 42–44.
63. Pan X., Chen F., Wu T., Tang H., Zhao Z., 2009: Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(4), 258-263.
64. PN-ISO 2917:2001: Meat and meat products – Measurement of pH – Reference method.
65. PN-ISO 4121:1998: Sensory analysis – Methodology – Evaluation of food products using scaling methods.
66. Pompei A., Cordisco L., Raimondi S., Amaretti A., Pagnoni U.M., Matteuzzi D., Rossi M., 2008: In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe*, 14, 280-286.
67. QDA ISO 13299.2:1998 Sensory analysis–methodology–general guidance for establishing a sensory profile. *Geneva, Switzerland: International Organisation of Standardisation*.
68. Ramnani P., Chitarrari R., Tuohy K., Grant J., Hotchkiss S., Philp K., Campbell R., Gill Ch., Rowland I., 2012: In vitro fermentation and prebiotic potential of low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe*, 18, 1-6.
69. Rezaei R., Khomeiri M., Aalami M. & Kashaninejad M., 2012: Effect of inulin on the physicochemical properties, flow behavior and probiotic survival of frozen yogurt. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2809–2814.
70. Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y., 2010: Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1-11.
71. Roberfroid M.B., 2007: Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition*, 137, 830-837.

72. Roberfroid M., Gibson G.R., Hoyles L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M.J., Léotoing L., Wittrant Y., Delzenne N.M., Cani P.D., Neyrinck A.M., Meheust A., 2010: Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104 (Suppl. 2), 1–63.
73. Ryan S.M., Fitzgerald G.F., van Sinderen D., 2006: Screening for and Identification of Starch-, Amylopectin-, and Pullulan-Degrading Activities in Bifidobacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5289-5296.
74. Simpson H.L. & Campbell B.J., 2015: Review article: dietary fibre–microbiota interactions. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 42, 158–179.
75. Sims I.M., Ryan J.L.J., Kim S.H., 2014: In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. *Anaerobe*, 25, 11-17.
76. Singh M., Kim S. & Liu S.X., 2012: Effect of purified oat  $\beta$ -glucan on fermentation of set-style yogurt mix. *Journal of Food*, 77, 195–201.
77. Singh R.S., Kaur N. & Kennedy J.F., 2015: Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. *Carbohydrate Polymers*, 123, 190–207.
78. Singh R.S., Saini G.K. & Kennedy J.F., 2008: Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73, 515–531.
79. Spears J.K., Karr-Lilienthal L.K., Grieshop C.M., Flickinger E.A., Wolf B.W., Fahey J.G.C., 2005: Glycemic, insulinemic, and breath hydrogen responses to pullulan in healthy humans. *Nutrition Research*, 25, 1029–1041.
80. Szydłowska A., Kołożyn-Krajewska D., 2010: Zastosowanie bakterii potencjalnie probiotycznych do fermentacji przecieru z dyni. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 6(73), 109-119.
81. Śliżewska K., Nowak A., Barczyńska R., Libudzisz Z., 2013: Prebiotyki – definicja, właściwości i zastosowanie w przemyśle. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 1 (86), 5 – 20.
82. Tilkens B.L., King A.M., Glass K.A. & Sindelar J.J., 2015: Validating the inhibition of *Staphylococcus aureus* in shelf-stable, ready-to-eat snack sausages with varying combinations of pH and water activity. *Journal of Food Protection*, 78, 1215–1220.
83. Turrone F., Ribbera A., Foroni E., van Sinderen D., Ventura M., 2008: Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 94, 35-50.
84. Vlahopoulou I. & Bell A.E., 1995: Preliminary studies on the gelation processes of GDL-acidified and fermented bovine and caprine milk systems. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 48, 112–116.
85. Wolf B.W., Garleb K.A., Choe Y.S., Humphrey P.M., Maki K.C., 2003: Pullulan is a slowly digested carbohydrate in humans. *Journal of Nutrition*, 133, 1051–1055.
86. Yang H.S., Choi S.G., Jeon J.T., Park G.B. & Joo S.T., 2007: Textural and sensory properties of low fat pork sausages with added hydrated oatmeal and tofu as texture-modifying agents. *Meat Science*, 75, 283–289.
87. Yoneyama M., Okada K., Mandai T., Aga H., Sakai S., Ichikawa T. 1990: Effects of pullulan intake in humans. *Denpun Kagaku (Starch Science)*, 37, 123-127.

88. Zare F., Boye J.I., Orsat V., Champagne C. & Simpson B.K., 2011: Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. *Food Research International*, 44, 2482–2488.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### Przed uzyskaniem stopnia doktora

Działalność naukową rozpoczęłam pod kierunkiem prof. dr hab. R. A. Grzybowskiego realizując pracę magisterską zatytułowaną „Analiza mikrobiologiczna procesu produkcji grzybni pieczarki” (1988r), która stanowiła analizę ekspercką problemu technologicznego zaistniałego w wytwórni grzybni pieczarki w Ożarowie Mazowieckim. Określono mikroflorę powietrza we wszystkich pomieszczeniach produkcyjnych, przy czym największą liczbę drobnoustrojów obserwowano w pomieszczeniach działu ekspedycji. Zanieczyszczone powietrze było źródłem zakażeń mikrobiologicznych grzybni pieczarki, przy czym wśród mikroorganizmów dominowały bakterie a ich przynależność rodzajową ustalono na *Escherichia*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*.

Po zatrudnieniu na stanowisko asystenta stażysty w Zakładzie Mikrobiologii Technicznej Wydziału Technologii Żywności SGGW w Warszawie uczestniczyłam w realizacji m.in. trzech projektów badawczych: „Studia nad czystością mikrobiologiczną i aktywnością fermentacyjną drożdży winiarskich” i „Badania ilościowe wybranych wyrobów spirytusowych” pod kierownictwem prof. dr hab. E. Sobczaka oraz „Badania czystości mikrobiologicznej emulsji” (kierownik tematu prof. dr hab. R. A. Grzybowski).

W okresie 19.09.1992–01.02.2002r., w związku z urodzeniem dzieci (1992, 1994 i 1996) przebywałam na urloпах macierzyńskich oraz bezpłatnych wychowawczych. Po powrocie do pracy, na stanowisku wykładowcy oprócz prowadzenia zajęć dydaktycznych zajmowałam się utrzymaniem Muzeum Czystych Kultur Drobnoustrojów.

W roku 2003 rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Nauk o Żywności SGGW pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Gniewosz. Celem mojej pracy doktorskiej było zastosowanie pullulanu w postaci powłoki jadalnej, jako czynnika kształtującego trwałość wybranych surowców roślinnych.

Wykazałam, że pullulan ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne może być składnikiem powłoki jadalnej przedłużającym trwałość wybranych surowców roślinnych. Szczególnie przydatny może być w przypadku żywności o niskiej aktywności wody. Stwierdzono zależność między grubością filmu i wilgotnością względną powietrza a przepuszczalnością tlenu i dwutlenku węgla, a w miarę wzrostu grubości filmu przy stałej wilgotności względnej powietrza wzrastała jego barierowość w stosunku do badanych gazów. Z kolei przy stałej grubości filmu przepuszczalność tlenu i dwutlenku węgla malała wraz z obniżeniem wilgotności względnej powietrza. Pullulan jako jedyne źródło węgla

w podłożu nie był całkowicie metabolizowany przez badane szczepy drobnoustrojów saprofitycznych a ograniczoną zdolność do asymilacji tego polisacharydu wykazywały pleśnie z rodzajów *Alternaria*, *Rhizopus*, *Penicillium* i *Aspergillus*, drożdże z rodzaju *Saccharomyces* oraz bakterie z rodzajów *Bacillus* i *Micrococcus*. Wykazałam, że zastosowana w badaniach modelowych powłoka pullulanowa zahamowała wzrost większości badanych drobnoustrojów, poprawiła wygląd orzechów i wpłynęła korzystnie na inne cechy sensoryczne jak również powodowała mniejsze ubytki masy orzechów podczas ich przechowywania. Powlekanie powłoką pullulanową skutkowało wolniejszym tempem zmian oksydacyjnych i hydrolitycznych zachodzących w tłuszczu orzechów w porównaniu z orzechami bez powłoki. Ponadto podczas przechowywania orzechów pokrytych powłoką obserwowano całkowite zahamowanie wzrostu szczepów z rodzajów *Aspergillus*, *Mucor* i *Cladosporium*. W przypadku bakterii powłoka pullulanowa skutecznie ograniczyła wzrost szczepów z rodzajów *Micrococcus* i *Tetracoccus*. Najmniej wrażliwe na obecność powłoki pullulanowej na orzechach były szczepy pleśni z rodzaju *Penicillium* oraz bakterie z rodzaju *Bacillus*.

#### Po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam zainteresowania naukowe w zakresie przydatności pullulanu do konstruowania powłok jadalnych i ich wpływu na przedłużenie trwałości wybranych surowców spożywczych. Wśród badanych surowców znalazły się surowce roślinne: jabłka, orzechy laskowe, włoskie i arachidowe. Wykazano, że powłoka pullulanowa najlepiej przedłużyła trwałość orzechów laskowych, ograniczając niekorzystne zmiany zachodzące w tłuszczach a przede wszystkim niekorzystne zmiany wywołane mikroflorą saprofityczną. Obserwowano całkowite zahamowanie wzrostu 21 z 36 badanych szczepów oraz częściowe ograniczenie wzrostu pozostałych szczepów. Efekt hamujący był zróżnicowany i wynosił od 63 do 100%, w szczególności pleśni. Zastosowana w badaniach powłoka pullulanowa wykazała dużą barierowość w stosunku do tlenu i dwutlenku węgla, co wpłynęło na hamowanie wzrostu większości badanych drobnoustrojów, odpowiedzialnych za psucie się żywności. Zwiększyła atrakcyjność sensoryczną orzechów poprzez nadanie im połysku. Powłoka pullulanowa oraz pullulanowo-białkowa zastosowana na jabłkach ograniczyła ubytek masy podczas przechowywanych, jednak była wrażliwa na zmiany wilgotności powietrza i przy zwiększonej wilgotności stawała się kleista. Za najważniejszy mechanizm ograniczający niekorzystne zmiany w powlekanych surowcach uznano małą przepuszczalność tlenu przez powłokę pullulanową.

Badano również wpływ powłoki jadalnej wytworzonej na bazie pullulanu, izolatu białka sojowego oraz kwasu stearynowego na zmiany mikrobiologiczne w mięsie wołowym. Zastosowanie powłoki jadalnej najskuteczniej zahamowało wzrost liczby bakterii tlenowych mezofilnych, LAB, enterokoków i psychrofilnych, redukując ich liczbę o 1 cykl logarytmiczny w porównaniu z próbkami kontrolnymi

(bez powłoki). Stopień zahamowania wzrostu badanych grup drobnoustrojów był jednak zbyt niski, aby można ją było stosować w przypadku surowca mięsnego. Naniesienie powłok pullulanowych na surowców o dużej zawartości wody jest utrudnione.

W kolejnych badaniach oznaczano możliwość wzbogacenia powłok jadalnych na bazie pullulanu o ekstrakty roślinne bogate w składniki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Badanie polegało na powlekanii papryki czerwonej powłoką pullulanową zawierającą ekstrakt wodny lub etanolowy kwiatów tawuły a następnie zakażaniu zarodnikami *Rhizopus arrhizus*. Wszystkie powłoki utworzyły cienką i dobrze przymocowaną dodatkową warstwę wzmacniającą połysk. Podczas przechowywania kolor oraz utrata masy produktów powlekanych podlegały mniejszym zmianom w porównaniu z niepowleczonymi. Wyniki jednoznacznie wskazały na możliwość zastosowania powłok pullulanowych zawierających ekstrakty jako alternatywy dla chemicznych środków grzybobójczych stosowanych do zwalczania chorób pleśniowych papryki.

Efektom tych badań było opublikowanie 7 artykułów naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i krajowym:

- **Chlebowska – Śmigiel A.**, Gniewosz M., Świńczak E. 2007: An attempt to apply a pullulan and pullulan-protein coatings to prolong apples shelf-life stability. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6 (1), 49 -56.
- **Chlebowska – Śmigiel A.**, Gniewosz M., Gąszewska M. 2008: An attempt to apply a pullulan coating to reduce oxidative changes and mass loss in nuts during storage. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58 (1), 79-84.
- **Chlebowska – Śmigiel A.**, Gniewosz M. 2009: Effect of pullulan coating on inhibition of chosen microorganisms' growth. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 8 (3), s. 37 – 46.
- **Chlebowska – Śmigiel A.**, Gniewosz M. 2009: Wpływ jadalnej powłoki pullulanowej na ograniczenie zmian sensorycznych i fizykochemicznych zachodzących w orzechach laskowych podczas przechowywania. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLII (3), s. 420-425.
- **Chlebowska – Śmigiel A.**, Gniewosz M., Sadło B. 2011: Próba przedłużenia jakości mikrobiologicznej mięsa wieprzowego poprzez zastosowanie powłoki jadalnej. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLIV (3), s. 683- 688.
- **Chlebowska – Śmigiel A.**, Hać- Szymańczuk E, Gniewosz M. 2014: Wpływ powłoki jadalnej na zmiany mikrobiologiczne w mięsie wołowym podczas przechowywania w warunkach chłodniczych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 577, 23-31.
- Synowiec A., Gniewosz M., Kraśniewska K., **Chlebowska - Śmigiel A**, Przybył J.L., Bączek K., Węglarz Z. 2014: Effect of Meadowsweet Flower Extract-Pullulan Coatings on *Rhizopus Rot* Development and Postharvest Quality of Cold-Stored Red Peppers. *Molecules*, 19(9), 12925-12939.

Moje inne zainteresowania naukowo-badawcze mieszczące się w dyscyplinie technologii żywności i żywienia realizowałam w następujących obszarach tematycznych:

1. Wpływ przechowywania i obróbki technologicznej na zmiany mikrobiologiczne i fizykochemiczne wybranych produktów spożywczych
2. Suplementacja podłoża hodowlanego związkami magnezu i jej wpływ na aktywność wybranych szczepów grzybów i bakterii kwasu mlekowego,
3. Przeciwdrobnoustrojowa aktywność bakterii mlekowych, produktów fermentowanych orientalnych i ekstraktów ziołowych,
4. Nowe trendy w technologii żywności - wykorzystanie właściwości funkcjonalnych EPS pochodzenia drożdżowego oraz wosku i pyłku pszczelego
5. Przechowywanie szczepów referencyjnych

### **5.1. Wpływ przechowywania i obróbki technologicznej na zmiany mikrobiologiczne i fizykochemiczne wybranych produktów spożywczych**

Odpowiednie postępowanie z surowcem spożywczym jest gwarancją otrzymania produktu dobrej jakości, ale równie ważny jest sposób postępowania z wytworzonym produktem, szczególnie warunki jego przechowywania i obróbki technologicznej. Zarówno zmiany fizykochemiczne, jak i mikrobiologiczne zachodzące w produktach spożywczych mogą być przyczyną ich zepsucia czy prowadzić do wystąpienia zatrucia pokarmowego.

Największym ryzykiem związanym z możliwością wystąpienia zanieczyszczeń mikrobiologicznych w jednodniowych sokach marchwiowych jest brak obróbki termicznej. Stwierdzono istotne różnice w jakości mikrobiologicznej soków między produktami różnych producentów, jednak w żadnym, zarówno bezpośrednio po otwarciu, a także po przechowywaniu nie stwierdzono obecności mikroflory patogennej, beztlenowców redukujących siarczyny oraz drobnoustrojów psychrofilnych. Analiza mikrobiologiczna soków wykazała natomiast obecność dużej liczby drobnoustrojów mezofilnych i bakterii mlekowych. Największe zastrzeżenia budziła obecność bakterii z grupy coli oraz enterokoków w badanych sokach, co mogło być wynikiem fekalnego zanieczyszczenia surowca lub użytej w procesie produkcyjnym wody. Przechowywanie soków po otwarciu w warunkach chłodniczych zwiększyło istotnie ogólną liczbę drobnoustrojów mezofilnych, grzybów, bakterii z grupy coli oraz enterokoków, co potwierdza zalecenia producenta odnośnie postępowania z takim produktem, jakim jest sok jednodniowy.

W swojej pracy badawczej zajmowałam się także zanieczyszczeniem mikrobiologicznym nasion rzepaku i uzyskanych z nich olejów tłoczonych na zimno. Zarówno w nasionach, jak i olejach określiłam ogólną liczbę drobnoustrojów oraz liczbę grzybów, ze względu na możliwość rozwoju grzybów toksynotwórczych. Poszczególne partie nasion rzepaku charakteryzowały się zróżnicowaną jakością mikrobiologiczną (OLD) rzędu  $10^3$  -  $10^4$  jtk/g, ale



zanieczyszczenie mikrobiologiczne uzyskanych z nich olejów tłoczonych na zimno było niskie ( $10^1$  do  $10^2$  jtk/ml). Oleje wirowane charakteryzowały się wyższą jakością niż oleje dekantowane. Sposób oczyszczania wpływał również na zmiany mikrobiologiczne olejów podczas przechowywania. Przechowywane przez 6 miesięcy oleje oczyszczane przez dekantowanie były gorszej jakości w porównaniu z olejami wirowanymi. Nastąpił wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów. Na nasionach oraz w olejach stwierdzono obecność bakterii przetrwalnikujących, drożdży oraz pleśni. Wśród grzybów dominującą mikroflorę stanowiły pleśnie z rodzaju *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Aspergillus* i *Cladosporium*.

- Gientka I, **Chlebowska – Śmigiel A.**, Sawikowska K. 2012: „Zmiany jakości mikrobiologicznej soków marchwiowych podczas prób przechowalniczych. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, XLV (3), s. 397 – 401.
- Wroniak M., **Chlebowska – Śmigiel A.**, 2013: Wpływ czystości nasion rzepaku i sposobu oczyszczania oleju na wybrane właściwości olejów tłoczonych na zimno. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 4 (89), s. 133 – 149.

## 5.2. Suplementacja podłoża hodowlanego związkami magnezu i jej wpływ na aktywność wybranych szczepów grzybów i bakterii kwasu mlekowego

Badano wpływ zwiększonej zawartości magnezu w hodowlach szczepów bakterii mlekowych (LAB): *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. sanfranciscensis* oraz drożdży *S. cerevisiae* na cechy mikrobiologiczne ciasta i wybrane cechy fizykochemiczne pieczywa. Do podłoża dodawano  $Mg^{2+}$  w stężeniu  $1,25\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Nie stwierdzono istotnego wpływu suplementacji magnezem hodowli drożdży i LAB na liczbę tych grup drobnoustrojów w ciastach. Przeprowadzono próbny wypiek laboratoryjny metodą jednofazową. Zaobserwowano, że w obecności kultur wzbogaconych w magnez zwiększona została objętość pieczywa. Największą zawartość magnezu stwierdzono w pieczywie z kulturą mieszaną z *S. cerevisiae* i *Lb. brevis* wzbogaconą w ten pierwiastek.

Brałam udział w pracach określających aktywność przeciwpleśniową bakterii z gatunków *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* oraz *Lactobacillus fermentum* po hodowli w podłożach z dodatkiem octanu magnezu w odniesieniu do grzybów strzępkowych *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus* *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium avenaceum*. Dodatek octanu magnezu do podłoża hodowlanego badanych bakterii wpływał indukująco na produkcję kwasu octowego przez te bakterie. W niewielkim stopniu dodatek wskazanej soli wpływał na syntezę kwasu mlekowego w hodowli bakterii *L. plantarum*. Obserwowano wyższy poziom zahamowania wzrostu badanych pleśni (za wyjątkiem gatunku *R. arrhizus*) po hodowli bakterii w podłożu MRS z dodatkiem octanu magnezu w porównaniu z podłożem niemodyfikowanym.

Wyniki tych prac opublikowano w następujących czasopismach o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym:

- Gniewosz M., **Chlebowska – Śmigiel A.**, Lipińska E., Kraśniewska K. 2014: Wpływ zwiększonej zawartości magnezu w hodowlach wybranych szczepów bakterii i drożdży na wybrane cechy jakościowe ciasta i pieczywa. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 578, 39-47.
- Kycia K., Bzducha – Wróbel A., Kraśniewska K., **Chlebowska – Śmigiel A.**, Gniewosz M., 2017: Effect of Magnesium Acetate on the Antimold Activity of *Lactobacillus*. Journal of Food Protection, 80 (1),96 – 103.

### 5.3. Przeciwdrobnoustrojowa aktywność bakterii mlekowych, produktów fermentowanych orientalnych i ekstraktów ziołowych

Moje zainteresowanie bakteriami mlekowymi dotyczy także możliwości wykorzystania zdolności tych mikroorganizmów do metabolizowania oraz wiązania toksycznych metabolitów pleśni. Przeprowadzona analiza danych literaturowych dotyczących badań *in vitro* oraz *in vivo* nad detoksykacją mykotoksyn przez różne szczepy bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w warunkach układu pokarmowego zwierząt stała się podstawą opracowania artykułu przeglądowego z tego zakresu opublikowanego w czasopiśmie Medycyna Weterynaryjna.

W kolejnej pracy podjęto próbę oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej płynów pochodzących z *L. rhamnosus* ATCC 7469 oraz zdolności szczepu do biosyntezy bakteriocyliny podczas hodowli w podłożu MRS. Z danych literaturowych wiadomo, że cechą tę posiada m.in. szczep *L. rhamnosus* GG. Okazało się, że płyn pochodzący z *L. rhamnosus* ATCC 7469 uzyskany po 24h inkubacji w temp. 37°C w podłożu MRS hamował wzrost testowych bakterii, zarówno Gram-dodatnich jak też Gram-ujemnych. Najbardziej wrażliwym na jego działanie okazał się *B. cereus* ATCC 11778 jednakże w badanych warunkach doświadczenia nie potwierdzono zdolności szczepu *L. rhamnosus* ATCC 7469 do wytwarzania bakteriocyliny. Na wzrost i biosyntezę bakteriocyn przez bakterie wpływa wiele czynników, do których należą źródła węgla i azotu, obecność innych substancji oraz warunki hodowli. Daje to możliwość dalszych badań nad opracowaniem optymalnego dla syntezy bakteriocyn składu podłoża hodowlanego.

- Bzducha-Wróbel A., Gniewosz M., **Chlebowska – Śmigiel A.** 2015: In vitro and in vivo mycotoxin binding by the bacteria of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. Medycyna Weterynaryjna, 71 (12), 729 – 808.
- Gientka I., Bugajewska A., **Chlebowska-Śmigiel. A.**, Kieliszek M., Misiura S.: 2016: Ocena zdolności przeciwdrobnoustrojowych i bakteriocynogennych *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 585, 65-73.

Tempeh jest tradycyjnym indonezyjskim produktem otrzymywanym z soi w wyniku naturalnej fermentacji przy udziale bakterii mlekowych, drożdży i różnych szczepów z rodzaju *Rhizopus*. Pierwsze doniesienia o antybakteryjnej aktywności izolatów z tempeh dotyczą wrażliwości bakterii *Streptococcus cremoris* na substancje antybakteryjne zawarte w tempeh. Podjęłam badania których celem było określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej tempeh naturalnego i wędzonego dostępnego w ofercie internetowej, wobec 4 szczepów bakterii testowych: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Stopień zahamowania wzrostu był różny w zależności od produktu, jak też badanego szczepu bakterii i wynosił od 1,60% do 24,22%. Oba badane produkty hamowały wzrost testowych szczepów bakterii, przy czym najbardziej wrażliwe okazały się bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076.

- **Chlebowska – Śmigiel A.**, Gientka I., Mroczek K. 2012: „Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej żywności typu tempeh”, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLV (3), s. 455 – 460.

Od kilku lat w obszarze alternatywnych metod utrwalania żywności przedmiotem badań są naturalne substancje wyizolowane z roślin, posiadające właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Należą do nich ekstrakty i olejki eteryczne pochodzące z roślin przyprawowych. Celem kolejnej pracy było otrzymanie olejków eterycznych z szałwii i oregano, określenie ich składu chemicznego oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do wybranych szczepów bakterii. Olejki eteryczne z szałwii i oregano odznaczały się aktywnością przeciwdrobnoustrojową względem większości użytych w doświadczeniu bakterii. Było to spowodowane zawartością w olejkach związków takich jak karwakrol, kamfora, linalol, R(+) limonen, 1,4-cyneol i  $\gamma$ -terpinen. Bakterie Gram-dodatnie były bardziej wrażliwe niż bakterie Gram-ujemne na działanie olejków z szałwii i oregano. Wśród bakterii Gram-dodatnich szczepem najbardziej wrażliwym na ich działanie okazał się *Tetracoccus sp.*, a wśród bakterii Gram-ujemnych – *Proteus mirabilis* 180 oraz *Proteus vulgaris* 458. Najsilniejsze działanie hamujące oraz bakteriobójcze (najniższe wartości MIC oraz MBC) w stosunku do większości badanych bakterii wykazywał olejek z oregano. Można wnioskować, że jest on źródłem substancji aktywnych, które hamują wzrost i rozwój wybranych szczepów bakterii. Uzyskane wyniki wskazują, że olejki eteryczne z szałwii i oregano mogą być skutecznymi środkami konserwującymi, wykorzystywanymi do utrwalania produktów spożywczych.

- Hać-Szymańczuk E., Lipińska E., **Chlebowska-Śmigiel A.** 2014: Porównanie działania przeciwdrobnoustrojowego olejków eterycznych z szałwii (*Salvia Officinalis* L.) i oregano (*Origanum Vulgare* L.). *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 577, 53-62.

#### 5.4. Nowe trendy w technologii żywności - wykorzystanie właściwości funkcjonalnych EPS pochodzenia drożdżowego oraz wosku i pyłku pszczelego

Produktami, które mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym są woski i pyłek pszczeli. Jestem współautorem artykułu przeglądowego, którego celem było omówienie unikalnych właściwości tych produktów i poszerzenie wiedzy o możliwościach ich wykorzystania. W artykule zawarto charakterystykę pyłku oraz pierzgi pszczelej jako nowych produktów, które mogą mieć potencjalne zastosowanie w różnych działach przemysłu spożywczego. Powstawanie pierzgi jest efektem fermentacji mlekowej pod wpływem bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Proces ten przebiega spontanicznie w plastrach, w warunkach beztlenowych. Wynikiem fermentacji i zachodzących przemian enzymatycznych jest uzyskanie nowych związków oraz zabezpieczenie pyłku przed utratą jego właściwości. Pierzga jest doskonałym produktem, który wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz może uzupełniać niedobory witamin i składników odżywczych w organizmie człowieka. Zastosowanie jej w produktach spożywczych, np. jako składnika o działaniu przeciwdrobnoustrojowym w powłokach jadalnych może dać możliwość uzyskania nowych produktów akceptowalnych przez konsumenta i przyjaznych środowisku naturalnemu.

Egzopolisacharydy drożdżowe nie są dobrze poznaną grupą metabolitów, a ich przemysłowe zastosowanie jest limitowane niską wydajnością biosyntezy. Udowodniono jednak, że związki mają potencjał immunostymulacyjny, przeciwutleniający oraz przeciwnowotworowy. Przedmiotem artykułu przeglądowego z tej tematyki było omówienie wpływu warunków hodowlanych na biosyntezę egzopolisacharydów przez drożdże oraz ich strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne.

- Kieliszek M., Piwowarek K., Kot A.M., Błażej St., **Chlebowska – Śmigiel A.**, Wolska I. 2018: Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170 – 180.
- Gientka I., Błażej St., Stasiak-Różańska L., **Chlebowska – Śmigiel A.** 2015: Exopolysaccharides from Yeast : insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties – review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(4), 283-292.

#### 5.5. Przechowywanie szczepów referencyjnych

Od początku zatrudnienia jestem odpowiedzialna na prowadzenie Muzeum Czystych Kultur ZBiMŻ. Do moich obowiązków należy przygotowanie szczepów pleśni, drożdży i bakterii do zajęć dydaktycznych oraz do badań naukowych prowadzonych przez pracowników naukowo-dydaktycznych. Dobieram warunki hodowli oraz przechowywania szczepów referencyjnych. Wiele szczepów izolowałam z produktów spożywczych, identyfikowałam oraz wprowadziłam do

Muzeum. W chwili obecnej Muzeum dysponuje ponad 120 szczepami bakterii, ponad 150 szczepami grzybów.

## 6. Podsumowanie pracy naukowo–badawczej

Podsumowując, na mój dorobek naukowy składa się:

- 10 publikacji z listy JCR w następujących czasopismach: Current Pharmaceutical Biotechnology, CyTa Journal of Food, International Journal of Dairy Technology, Molecules, Journal of Food Protection, Trends in Food Sciences and Technology, Medycyna Weterynaryjna, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość
- 14 publikacji z listy B
- 5 monografii i rozdziałów w monografii
- 10 ekspertyz
- 14 doniesień naukowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci referatów
- 24 doniesienia naukowe na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci posterów
- 2 udziały w komitetach konferencji naukowych
- udział w 4 projektach jako wykonawca
- 4 staże naukowe
- 5 recenzji artykułów w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym

Sumaryczny *impact factor* publikacji w których jestem współautorem wynosi

**IF = 17,609\***,

a łączna liczba punktów zgodnie z kryteriami MNiSW wynosi **369\*\***

**Index Hirscha = 3**

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS):

22 (20 bez autocytowań).

Liczba cytowań publikacji według bazy Elsevier Scopus:

30 (29 bez autocytowań).